



FACULTAD DE MEDICINA

**RECONSTRUCCIÓN DE LA SUPERFICIE OCULAR
MEDIANTE EXPANSIÓN “EX VIVO”
DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES
DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO**

TESIS DOCTORAL

ALMUDENA DEL HIERRO ZARZUELO

Madrid, 2012



FACULTAD DE MEDICINA

**RECONSTRUCCIÓN DE LA SUPERFICIE OCULAR
MEDIANTE EXPANSIÓN “EX VIVO”
DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES
DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO**

TESIS DOCTORAL

ALMUDENA DEL HIERRO ZARZUELO

Madrid, 2012



FACULTAD DE MEDICINA

**RECONSTRUCCIÓN DE LA SUPERFICIE OCULAR
MEDIANTE EXPANSIÓN “EX VIVO”
DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES
DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO**

TESIS DOCTORAL PRESENTADA POR :

ALMUDENA DEL HIERRO ZARZUELO

DIRIGIDA POR :

D. ANA MARIA BOTO DE LOS BUEIS

D. IGNACIO GARCÍA GÓMEZ

D. MARIANO GARCÍA ARRANZ

Doña ANA MARÍA BOTO DE LOS BUEIS, Médico Adjunto del Servicio de Oftalmología del Hospital Universitario La Paz, Don IGNACIO GARCÍA GÓMEZ, investigador en University of Illinois at Chicago, Department of Medicine y DON MARIANO GARCÍA ARRANZ, profesor asociado del Departamento de Cirugía de la Autónoma y director científico del laboratorio de Terapia Celular de la Unidad de Investigación del Hospital Universitario La Paz,

CERTIFICAN:

Que Doña ALMUDENA DEL HIERRO ZARZUELO, Médico Adjunto del Servicio de Oftalmología del Hospital Universitario La Paz, ha estado trabajando bajo su dirección en el proyecto titulado “Reconstrucción de la Superficie Ocular mediante expansión “ex vivo” de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo”, que ha sido desarrollado en la Unidad de Investigación de la Fundación Biomédica del Hospital Universitario La Paz, para optar al grado de Doctor en Medicina.

Dicho trabajo reúne, a su juicio, las condiciones de originalidad y rigor metodológico necesarias para que pueda ser sometido a su lectura y discusión ante el tribunal

Madrid, 5 de octubre de dos mil doce

Fd. Dra. Ana Boto de los Bueis
Director de Tesis

Fd. Dr. Ignacio García Gómez
Director de Tesis

Fd. Dr. Mariano García Arranz
Profesor asociado/Tutor de Tesis

*A mis padres,
con todo mi cariño.*

AGRADECIMIENTOS

La realización de esta tesis doctoral en el campo de la investigación animal ha supuesto para mí un complemento muy importante y considero que necesario en este momento de mi actividad profesional.

Desde los inicios de este trabajo, con el famoso “boca a boca” a aquel conejo que entraba en parada, hasta llegar al estudio de los cortes de inmunofluorescencia han transcurrido muchas anécdotas, momentos de desesperación y otros de satisfacción por cómo iban saliendo los experimentos. Y sobre todo, considero que ha ido creciendo la forma de estructurar mi pensamiento científico en el campo de la investigación, y me ha ayudado a valorar de una forma más objetiva el trabajo de tantos profesionales que se dedican en exclusiva a este campo.

Esta tesis doctoral es fruto de la colaboración y coordinación de un gran equipo al que quiero reconocer su total disponibilidad, accesibilidad, generosidad, amabilidad y sobre todo, su inmensa profesionalidad.

A estas personas quiero expresar mi más profundo agradecimiento:

En primer lugar, a mis directores de tesis:

A la ***Dra Ana Boto***. Mis agradecimientos van más allá que por la dirección de esta tesis. Gracias Ana a todos los niveles. Aunque mi interés por la córnea ya venía del Clínico, contigo encontré una maestra y un gran estímulo. Gracias por transmitirme tu experiencia, tu orientación y el apoyo. Por esa rigurosidad que te caracteriza y ese saber estar en los momentos de tensión. Gracias por el entusiasmo, y por contagiarme el amor por la córnea, la ilusión para querer mejorar y hacer nuevas cosas. Espero que esta tesis ayude a conseguir un nuevo hito en la consulta uno. Es un placer trabajar así.

Al ***Dr Ignacio García***. Nacho, gracias por guiarme en mis primeros pasos en el mundo de la Terapia Celular, por esa meticulosidad en el procedimiento, en la redacción y en la dirección de esta tesis. Eres una parte importante de este trabajo. Gracias por mostrarme más de cerca el mundo de la investigación y por los whats apps y esas largas conversaciones a cualquier hora desde Chicago. Estoy convencida que tus proyecciones profesionales serán muy amplias.

Al **Dr Mariano García**, por abrirnos las puertas de la Unidad de Investigación desde el primer momento de forma desinteresada, facilitandonos los medios necesarios para la realización de esta tesis, por su ayuda y orientación en todo momento.

Al **personal de la Unidad del Laboratorio de investigación de la fundación Biomédica del Hospital La Paz**, en especial a **David Alonso**, por la preparación de los cultivos celulares en las diferentes formas de aplicación, a **Rocío Cano**, por la elaboración de los cortes histológicos, a **Luz Vega, Susana Olmedillas y Tomás Robredo** por su constante orientación.

Al **Dr Alfredo Insausti**, excelente compañero, por su colaboración en la puesta a punto de este trabajo, el apoyo y por todos los buenos momentos compartidos.

Al **personal del animalario, Carlota**, la veterinaria, celadores y auxiliares: **Isabel, Toñi, Juan, Pablo, Pedro**, por cuidar de mis conejitos durante todo este tiempo.

Al **Dr Luis Rivas**, del Hospital Ramón y Cajal por su colaboración con la realización de las citologías de impresión.

Al **Dr Mario Prieto**, anatomopatólogo del Hospital La Paz, por su infinita paciencia y las tardes de hospital dedicadas en la revisión de los cortes histológicos.

Al **Centro Integrado de investigación Biomédica de Murcia**, en especial al **Dr Miguel Blanquer y a David García**, por la caracterización de las células.

Al **Departamento de Estadística, Belén y Elia**, por el análisis de los resultados.

A **Francisco Gayá y a Montse**, por su ayuda y su total disposición para dar formato físico a este trabajo.

Además de en el plano profesional, las siguientes personas contribuyen diariamente a mi bienestar y son el estímulo para que éste y otros trabajos se desarrollen. Quiero agradecer:

A **mis padres, Vicente y Neli**, por su preocupación en mi formación desde siempre y por darme todo lo mejor. Por los consejos sabios y siempre acertados, por la motivación y los valores que me habéis transmitido a lo largo de todos estos años. Sois el mejor ejemplo que la perseverancia y el trabajo son las mejores armas para conseguir los triunfos. GRACIAS POR TODO.

A **mi familia**, en especial a **mi tío Fernando**, una de las mejores personas que conozco; a su mujer, por estar a su lado y contribuir a ello.

A mis amigos, por apoyarnos mutuamente en nuestras trayectorias profesionales. Gracias por los buenos momentos, los viajes y todas las confidencias compartidas.

A Concha Hernández, maestra, compañera generosa y sobre todo amiga.

Al Jefe de Servicio Dr Agustín Fonseca y al Dr Félix Armadá por confiar en mí a lo largo de estos años y por brindarme la oportunidad de desarrollarme en lo que más me apasiona.

A mis compañeros de trabajo, todos y cada uno de los médicos adjuntos y residentes del Hospital La Paz. Gracias por el apoyo en cada momento, las risas, las palabras amables, esas comidas en el Mac. Así es una gozada trabajar.

A los compañeros de Clínica Moncloa, en especial a aquellos que me sirven de estímulo y ejemplo.

Al Departamento de USIO, por mostrarme atractivo el mundo de la córnea desde mi período de residente.

A todos los que no menciono y que de alguna manera contribuyen a estimular en mí sentimientos de responsabilidad, ilusión y mi afán por mejorar.

Gracias *Señor*, por hacer realidad este sueño.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	I
ABREVIATURAS	VI
ÍNDICE DE TABLAS	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	XII
RESUMEN / ABSTRACT	1
INTRODUCCIÓN.....	4
1. La Superficie Ocular y el Limbo esclerocorneal	5
1.1. Anatomía de la córnea.....	5
1.2. Anatomía del limbo esclerocorneal.....	7
1.2.1. Células madre limbares	8
1.2.2. El nicho limbar	8
1.2.2.1. Fisiología de la regeneración corneal.....	10
1.3. Anatomía de la conjuntiva ocular	11
2. Afectación de la superficie ocular tras causticación.....	11
2.1. Daño y regeneración epitelial	12
2.2. Daño y regeneración del estroma corneal	13
2.3. Papel de la inflamación en la causticación corneal.....	13
2.3.1. Tratamiento de la Causticación corneal en fase inflamatoria.....	14
3. INSUFICIENCIA LÍMBICA	15
3.1. Etiología.....	16
3.2. Diagnóstico	17
3.2.1. Clínico	17
3.2.2. Citología de Impresión	17
3.2.3. Microscopía confocal	18
4. TRATAMIENTO DE LA INSUFICIENCIA LÍMBICA.....	18
4.1. Tratamiento de la Insuficiencia Límica parcial.....	19
4.1.1. Epiteliectomía conjuntival sectorial e Injerto de Membrana Amniótica	20
4.2. Tratamiento de la Insuficiencia Límica total	20
4.2.1. Autoinjerto de limbo y conjuntiva autólogo (CLAU)	21
4.2.2. Injerto queratolimbar alogénico (LKAL), Injerto conjuntivolimbar de donante vivo (lr-CLAL) y queratoplastia excéntrica.....	21
4.2.3. Terapia Celular. Expansión ex vivo de células madre	23

4.2.3.1. Expansión ex vivo de células madre limbares (CLET) autólogas y alogénicas	23
4.2.3.2. Trasplante de láminas de epitelio mucoso oral cultivado autólogo (COMET)	25
5. CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES	26
5.1. Células madre derivadas de tejido adiposo (ASCs)	27
5.2. Uso de células mesenquimales en patología ocular. Estado actual del tema.	30
OBJETIVOS	32
MATERIAL Y MÉTODOS	34
1. MODELO EXPERIMENTAL DE INSUFICIENCIA LÍMBICA	35
1.1. modelo experimental de insuficiencia límbica generado por agresión química.....	35
1.2. Caracterización del daño: Citología de impresión.	35
1.3. Preparación del donante y estratificación de la muestra.	37
1.3.1. Preparación del donante	37
1.3.2. Estratificación de la muestra. Grupos experimentales	37
2. AISLAMIENTO, CULTIVO y CARACTERIZACIÓN DE ASCs.....	37
3. PREPARACIÓN DE IMPLANTES PARA LAS DISTINTAS APLICACIONES Y PROCEDIMIENTO DE APLICACIÓN:	39
3.1. Preparación de suspensión de ASCs.	39
3.2. Preparación de injertos de ASCs sobre Membrana Amniótica (MA-ASCs).....	39
3.3. Procedimiento inyección.....	39
3.4. Colocación del injerto de MA.....	40
4. EVALUACIÓN CLÍNICA.....	41
5. SACRIFICIO Y ESTUDIO HISTOLÓGICO E INMUNOHISTOQUÍMICO	41
5.1. HISTOLOGÍA	41
5.1.1. Fijación e inclusión en parafina.....	41
5.1.2. Tinción hematoxilina-eosina	42
5.1.3. Tinción PAS	42
5.1.4. Técnica inmunohistoquímica.....	42
5.1.5. Evaluación histológica e inmunohistoquímica.....	44
6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	45
RESULTADOS	46
1. CONFIRMACIÓN DEL MODELO DE INSUFICIENCIA LÍMBICA MEDIANTE CITOLOGÍA DE IMPRESIÓN.....	47

2. CARACTERIZACIÓN IN VITRO DE ASCs	47
3. INMUNOLocalIZACIÓN DE ASCs	49
3.1. En el implante de MA-ASCs	49
3.2. Inmunolocalización de ASCs en el tejido ocular	50
4. RESULTADOS BIOMICROSCÓPICOS	51
4.1. ANÁLISIS DE LOS OJOS TRATADOS CON ASCs VS NO TRATADOS CON ASCs	51
4.1.1. Perforación corneal.....	51
4.1.2. Adelgazamiento corneal	51
4.1.3. Calcificación corneal	52
4.1.4. Neovascularización corneal	53
4.1.5. Defecto epitelial	54
4.2. ANÁLISIS POR SUBGRUPOS SEGÚN MODELO DE ADMINISTRACIÓN.....	55
4.2.1. GRUPO INYECCIÓN	55
4.2.1.1. Perforación corneal	55
4.2.1.2. Adelgazamiento corneal.....	56
4.2.1.3. Calcificaciones corneales	56
4.2.1.4. Neovascularización corneal	56
4.2.1.5. Defecto epitelial	57
4.2.2. GRUPO MEMBRANA AMNIÓTICA	59
4.2.2.1. Perforación corneal	59
4.2.2.2. Adelgazamiento corneal.....	60
4.2.2.3. Calcificaciones	60
4.2.2.4. Neovascularización corneal	60
4.2.2.5. Defecto epitelial	61
4.3. COMPARACIÓN ENTRE AMBOS GRUPOS DE TRATAMIENTO (INYECCIÓN ASCS VS MA-ASCs).....	62
4.3.1. Perforación corneal.....	63
4.3.2. Calcificaciones corneales	63
4.3.3. Neovascularización corneal.....	63
4.3.4. Defecto epitelial	65
4.4. INFLUENCIA DE LA MEMBRANA AMNIÓTICA (MA vs INYECCIÓN DE SUERO SALINO)	65
4.4.1. Perforaciones corneales	66
4.4.2. Calcificaciones corneales	66
4.4.3. Neovascularización corneal.....	66
4.4.4. Defecto epitelial	67
5. RESULTADOS HISTOLÓGICOS	68
5.1. GRUPO INYECCIÓN	68
5.1.1. Celularidad inflamatoria en limbo y córnea	68
5.1.2. Fibrosis limbar y corneal	72

5.1.3. Valoración Células caliciformes: Tinción PAS.....	72
5.1.4. Valoración del Fenotipo epitelial corneal: CK3.....	73
5.2. GRUPO MEMBRANA AMNIÓTICA.....	74
5.2.1. Celularidad inflamatoria en limbo y córnea	74
5.2.2. Fibrosis limbar y corneal	77
5.2.3. Valoración de células caliciformes: PAS	78
5.2.4. Valoración del Fenotipo epitelial: CK3.....	78
DISCUSIÓN.....	79
1. EVALUACIÓN DEL MODELO EXPERIMENTAL.....	80
2. DETERMINACIÓN DE ASCs EN LOS IMPLANTES E IMMUNOLocalización OCULAR.....	83
3. EVALUACIÓN CLÍNICA.....	84
3.1. Neovascularización corneal	84
3.2. Defecto epitelial	87
3.3. Perforación corneal, adelgazamiento y calcificaciones corneales.	89
4. EVALUACIÓN HISTOLÓGICA	90
4.1. Efecto antiinflamatorio	90
5. EVALUACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA	92
5.1. Fibrosis corneal	92
5.2. Diferenciación epitelial	93
6. Procedimiento de aplicación.....	94
7. PERFECCIONAMIENTO DEL MODELO APLICADO Y PERSPECTIVAS FUTURAS.	96
CONCLUSIONES.....	98
BIBLIOGRAFÍA	100

ABREVIATURAS

ASCs: Células madre derivadas de tejido adiposo

AV: Agudeza visual

BCAV: Mejor agudeza visual corregida

CK: Citoqueratina

CLAU: Autoinjerto de limbo y conjuntiva

CLET: Trasplante epitelial limbar cultivado

COMET: Trasplante epitelial de mucosa oral cultivado

CyA: Ciclosporina A

DAPI: 40,6 Diamino-2-fenilindol

DE: Defecto epitelial

Endotel: Endotelio

Epi: Epitelio

Estr: Estroma

FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos

GFP: Proteína verde fluorescente

HGF: Factor de crecimiento de hepatocitos

IL: Interleuquina

KGF: Factor de crecimiento de keratinocitos

KLAL: Aloinjerto queratolimbar

KP: Queratoplastia

L: Linfocitos

LESCs: Células madre epiteliales limbares

LMSCs: Células madre mesenquimales limbares

Lr-CLAL: Aloinjerto conjuntivolimbar de donante vivo

MA: Membrana Amniótica

MA-ASCs: Membrana amniótica con células madre derivadas de tejido adiposo

MMP: Metaloproteasa

MO: Médula ósea

MPC: Proteína quimiotáctica de monocitos y macrófagos

MSCs: Células madre mesenquimales

MUC5AC: Mucina tipo 5AC

NA: no aplicable

NGF: Factor de crecimiento neuronal

NVC: Neovascularización corneal

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PI: Plasmáticas

PMN: Polimorfonucleares

POC: Penfigoide ocular cicatricial

SFB: Suero Fetal bovino

SNC: Suero normal de cabra

SO: Superficie ocular

SSJ: Síndrome de Steven-Johnson

TGF: Factor de crecimiento tumoral

TSP-1: Tromboespondina 1

VEGF: Factor de crecimiento endotelial
vascular

Iny: Inyección

Iny-ASCs: Inyección de células madre
derivadas de tejido adiposo

Iny-SS: Inyección de Suero Salino

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Se compara el rendimiento en cuanto a la fuente de extracción de células madre mesenquimales procedentes de médula ósea (MO- MSCs) o de tejido adiposo (ASCs).....	29
Tabla 2.	Clasificación de los grados de metaplasia escamosa del epitelio corneal mediante citología de impresión. La evaluación se realiza en función del tamaño de las células, de la relación entre el tamaño del núcleo (n) y su citoplasma (c), y de las características de los núcleos.	36
Tabla 3.	Parámetros evaluados en el estudio histológico e inmunohistoquímico al sacrificio.	44
Tabla 4.	Distribución del evento perforación corneal en función de la aplicación de ASCs.	51
Tabla 5.	Distribución del evento adelgazamiento corneal en función de la aplicación de ASCs.....	52
Tabla 6.	Distribución del evento calcificación corneal en función de la aplicación de ASCs.....	52
Tabla 7.	Media y desviación estándar del porcentaje de área de NVC según grupo de aplicación y su evolución en el tiempo.....	53
Tabla 8.	Media y desviación estándar del porcentaje de área de DE en ojos con y sin aplicación y su evolución en el tiempo.	54
Tabla 9.	Distribución del evento perforación corneal en el modelo de aplicación inyección según el grupo de administración.....	55
Tabla 10.	Distribución del evento adelgazamiento corneal en el modelo de aplicación inyección según el grupo de administración.	56
Tabla 11.	Distribución del evento calcificación corneal en el modelo de aplicación inyección según el grupo de administración.	56
Tabla 12.	Media y desviación estándar del porcentaje de área de NVC en el modelo de aplicación inyección según grupo de administración y su evolución en el tiempo.....	56
Tabla 13.	Media y desviación estándar del porcentaje de área de DE en el modelo de aplicación inyección según grupo de administración y su evolución en el tiempo.....	57
Tabla 14.	Distribución del evento perforación corneal en el modelo de aplicación MA según grupo de administración.....	59
Tabla 15.	Distribución del evento adelgazamiento corneal en el modelo de aplicación MA según grupo de administración.	60
Tabla 16.	Distribución del evento calcificación corneal en el modelo de aplicación MA según grupo de administración.	60
Tabla 17.	Media y desviación estándar del porcentaje de NVC en el modelo de aplicación MA según grupo de administración y su evolución en el tiempo.	60
Tabla 18.	Media y desviación estándar del porcentaje de DE en el modelo de aplicación MA según grupo de administración y su evolución en el tiempo.	61
Tabla 19.	Media y desviación estándar del porcentaje de NVC en ojos tratados con ASCs según el modelo de aplicación y su evolución en el tiempo.....	63
Tabla 20.	Media y desviación estándar del porcentaje de NVC en ojos tratados con ASCs según el modelo de aplicación y su evolución en el tiempo.....	65

Tabla 21. Distribución del evento perforación corneal en el grupo MA vs inyección de Suero Salino.	66
Tabla 22. Distribución del evento calcificación corneal en el grupo MA vs inyección de Suero Salino.	66
Tabla 23. Media y desviación estándar del porcentaje de NVC en ojos tratados con MA y mediante inyección de SS y su evolución en el tiempo.	66
Tabla 24. Media y desviación estándar del porcentaje de área de DE en ojos tratados con MA y mediante inyección de SS y su evolución en el tiempo	67
Tabla 25. Tipo de patrón inflamatorio a nivel del limbo en el grupo tratado mediante inyección de ASCs (Iny-ASCs) y en el grupo control (Iny-SS) a las 4 semanas.	70
Tabla 26. Tipo de patrón inflamatorio a nivel corneal en el grupo tratado mediante inyección de ASCs (Iny-ASCs) y en el grupo control (Iny-SS) a las 4 semanas.	71
Tabla 27. Tipo celular y grado de inflamación en el limbo y en la córnea de ojos tratados mediante inyección de ASCs (Iny-ASCs) o de suero salino (Iny-SS). A excepción del ojo G, los resultados se presentan a 4 semanas. PMN: polimorfonucleares, Pl: células plasmáticas, L: linfocitos, NA: no aplicable. Los valores entre paréntesis representan los grados de fibrosis corneal. Grados de Inflamación y fibrosis: 1+: corresponde a leve, 2+: moderada, 3+: severo ,4+: muy severa.	71
Tabla 28. Tipo celular y grado de inflamación en cornea y limbo en ojos del grupo MA-ASCs y en el grupo MA. Los resultados son a 4 semanas, salvo los ojos A, C, E, que se exponen en los tiempos indicados en semanas (s). PMN: polimorfonucleares, Pl: células plasmáticas, L: linfocitos, NA: no aplicable. Grados de Inflamación y fibrosis: 1+: leve, 2+: moderada, 3+: severa, 4+: muy severa. Entre paréntesis se muestran los grados de fibrosis.	77
Tabla 29. Trabajos publicados en la literatura donde se muestran distintos modelos animales de insuficiencia límbica generados por causticación química.82	

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Estructura de la córnea en un corte transversal teñido con hematoxilina-eosina. Epi: epitelio, Estr: estroma, Endotel: endotelio.(40x).	6
Figura 2.	Anatomía del limbo esclerocorneal. A: Empalizadas de Vogt. B: Corte transversal del limbo esclerocorneal. Tinción con hematoxilina-eosina. (20x). C: Corte histológico limbar. Se muestran las criptas donde asientan las LECS (40x)	7
Figura 3.	Esquema que muestra la composición del nicho de las células madre epiteliales limbares. Modificado de Li, Hayashida (2007).	9
Figura 4.	Esquema de la regeneración del epitelio corneal. Modificado de Schlötzer-Schrehard and Kruse, (2005)	10
Figura 5.	Paciente con un cuadro de Insuficiencia Límica total tras causticación química. Se muestra la neovascularización corneal. Departamento de Córnea, Hospital Universitario La Paz.	16
Figura 6.	Paciente con insuficiencia límbica desarrollada sobre un trasplante corneal. A: Se muestra la conjuntivalización y la neovascularización corneal sobre una queratoplastia penetrante en un paciente que padecía insuficiencia límbica total previa al trasplante de córnea. B: Conjuntivalización corneal: se muestra la irregularidad del epitelio corneal. Imagen con luz cobalto. Departamento de Córnea, Hospital Universitario La Paz.	19
Figura 7.	Paciente con insuficiencia límbica parcial y tratamiento quirúrgico empleado. A: Se muestra la conjuntivalización en un sector de la córnea, llegando a eje visual. B: Tratamiento aplicado: Se muestra el parche de Membrana Amniótica tras epiteliectomía. Departamento de Córnea, Hospital Universitario La Paz.	20
Figura 8.	Algoritmo terapéutico de la Insuficiencia Límica. KLAL: injerto queratolimbar alogénico, CLAU: Autoinjerto limbar conjuntival, CLET: Expansión ex vivo de células madre limbares. Modificado de Dua y Miri (Dua, Miri et al., 2010).	26
Figura 9.	Esquema que muestra la grasa y la fracción vasculoestromal donde se encuentran las células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo.	28
Figura 10.	Procedimiento de aplicación de Inyección de ASCs. Se aplican las ASCs mediante inyección en conjuntiva limbar en los 4 cuadrantes.	40
Figura 11.	Procedimiento de aplicación MA-ASCs. A: Se muestran los discos de MA con ASCs para implantar. B: Liberación de epitelio conjuntival y posicionamiento mediante sutura de nylon. C: Se aprecia la MA suturada sobre la superficie ocular.	40
Figura 12.	Esquema general de los principales puntos realizados en Material y Método. A: Aislamiento y preparación de ASCs. B: Creación de un modelo de causticación mediante aplicación de NaOH 1% durante 10 segundos en ojos de conejos albinos raza New Zealand. C: Generación del cuadro de Insuficiencia Límica: aspecto clínico y confirmación por citología de impresión a la semana del daño. D: Modelo de administración: aplicación de ASCs mediante procedimiento inyección frente al modelo de aplicación sobre MA.	45

Figura 13.	Insuficiencia Límbrica. Aspecto clínico y citología de impresión de la córnea a la semana de la causticación. A: Se muestra la NVC, opacidad e irregularidad corneal propios de la Insuficiencia límbrica. B: Citología de Impresión: Observamos la existencia de células caliciformes y metaplasia escamosa con núcleos picnóticos (40x)	47
Figura 14.	Cultivos celulares de ASCs. Microscopía de contraste de fases. Se aprecian las células con una morfología fusiforme y entrelazadas al llegar a confluir en el cultivo primario.....	48
Figura 15.	Histogramas que muestran tras análisis en el citómetro de flujo, la alta expresión de los marcadores de superficie CD90 y de CD44 y la negatividad para HLA-DR, CD45 y CD 34 en las ASCs testadas.....	48
Figura 16.	Diferenciación de ASCs a linaje adipogénico y osteogénico con sus respectivos controles. A: A la derecha se observa la tinción de la grasa con Red Oil, propia del tejido adiposo; a la izquierda su control. B: A la derecha observamos la matriz ósea que representa al tejido osteogénico, teñida con Alizarín Red; se muestra el control a la izquierda.	49
Figura 17.	Injertos de MA-ASCs. A: Fotografía combinada de fluorescencia con contraste de fases que muestra las células ASCs marcadas con GFP sobre el sustrato de MA. B: Se muestra por inmunotinción la estructura de la membrana amniótica con las células epiteliales cuyos núcleos están teñidos con DAPI (azul), y son positivas para citoqueratinas (rojo). Las ASCs marcadas con GFP se muestran de color verde y están dispuestas sobre la cara estromal de la MA.	50
Figura 18.	Inmunolocalización de ASCs en el tejido ocular. A: Se demuestra la existencia de células ASCs marcadas con GFP (rojo) a nivel subconjuntival en el procedimiento inyección a las 24 horas de su aplicación. B: Existencia de una célula ASCs marcadas con GFP (rojo) a las 4 semanas en el procedimiento Membrana Amniótica.	50
Figura 19.	Fotografía que muestra adelgazamientos corneales con diferentes grados de severidad. A: La imagen muestra adelgazamiento estromal anterior correspondiente a un ojo tratado con ASCs. B: Se muestra un ojo no tratado con ASCs, a las tres semanas de causticación, que presenta un descematocele y perforación inminente.....	52
Figura 20.	Fotografía de la SO correspondiente a un ojo no tratado con ASCs donde se muestran las calcificaciones corneales a nivel central.	53
Figura 21.	Medias estimadas del porcentaje de área de NVC y su evolución en ojos con y sin aplicación de ASCs.	54
Figura 22.	Medias estimadas del porcentaje de área de DE y su evolución en ojos con y sin la aplicación de ASCs.	54
Figura 23.	Medias estimadas del porcentaje de NVC y su evolución en el modelo de aplicación inyección según grupo de administración.	57
Figura 24.	Medias estimadas del porcentaje de DE y su evolución en el modelo de aplicación inyección según el grupo de administración.	58
Figura 25.	Se muestra mediante tinción con fluoresceína el cierre del defecto epitelial en un ojo tratado mediante inyección de ASCs. A: a la semana de su aplicación, B: a 2 semanas, C: 3 semanas y D: 4 semanas.	58

Figura 26.	Descematocele corneal en un ojo control a las 2 semanas de la aplicación de la MA. Se observa la persistencia de MA retraída hacia superior.....	59
Figura 27.	Medias estimadas del porcentaje de NVC y su evolución en el modelo de aplicación MA según grupo de administración.	61
Figura 28.	Medias estimadas del porcentaje de DE y su evolución en el modelo de aplicación MA según grupo de administración.	62
Figura 29.	Fotografía de la superficie ocular que muestra el defecto epitelial central mediante tinción con fluoresceína y luz azul cobalto en un ojo tratado con MA-ASCs a las 4 semanas de implantación.	62
Figura 30.	Medias estimadas del porcentaje de NVC y su evolución en ojos tratados con ASCs en sus dos modalidades de MA-ASCs e Iny-ASCs.....	64
Figura 31.	Se muestra la NVC en ojos tratados mediante ASCs. A: Procedimiento Iny-ASCs. A1: NVC en tiempos basales; A2:NV a las 4 semanas de la aplicación. B: Procedimiento MA-ASCs. B1: basal; B2: a las 4 semanas tras aplicación de implantes de MA-ASCs. En ambos procedimientos la NVC a las 4 semanas es superior a la ocurrida en etapas iniciales.....	64
Figura 32.	Medias estimadas del porcentaje de área DE en ojos tratados con ASCs en sus dos modalidades de MA-ASCs e Iny-ASCs y su evolución en el tiempo.	65
Figura 33.	Medias estimadas del porcentaje de área de NVC en ojos con implantación de MA vs Inyección de Suero Salino y su evolución en el tiempo.	67
Figura 34.	Medias estimadas del porcentaje de área de DE y su evolución en ojos con implantación de MA vs inyección de SS.	68
Figura 35.	Sección histológica del limbo esclerocorneal, córnea y conjuntiva a las 4 semanas tras tratamiento mediante inyección de ASCs . Tinción hematoxilina-eosina(10x). Se muestra el patrón inflamatorio crónico en banda de grado leve a base de linfocitos tanto a nivel subconjuntival, como limbar y en córnea periférica. En la esquina inferior derecha a mayor aumento se puede apreciar la naturaleza linfocitaria del infiltrado.....	69
Figura 36.	Fotografías que muestran el patrón inflamatorio en dos cortes histológicos corneales con tinción hematoxilina-eosina en ojos a 4 semanas. A: El corte corresponde a un ojo del grupo Iny-ASCs. Se observa un infiltrado inflamatorio crónico a base de mononucleares de grado leve. Se muestra un epitelio con escaso número de capas celulares (10x). B; Corte histológico corneal correspondiente a un ojo con Iny-SS. El grado de celularidad es moderado. En la esquina inferior izquierda revela a mayor aumento la inflamación de tipo aguda, a base de PMN neutrófilos (4x). C: Calcificaciones distróficas correspondientes al mismo ojo que B. (20x)	70

Figura 37.	Visualización de la expresión de α -actina a nivel limbar. Microscopía de fluorescencia. A: Expresión de α -actina (rojo) en un limbo de un ojo normal (20x). La α -actina se localiza alrededor de los vasos limbares. Los núcleos marcados con DAPI aparecen en azul. B: Expresión de α -actina en limbo de un ojo tratado mediante inyección de ASCs. Se observan trazas dispuestas en el espesor del espacio limbar.(10x).....	72
Figura 38.	Corte histológico corneal con tinción PAS en un ojo con aplicación de Iny-ASCs. Se observa la existencia de células caliciformes en el epitelio corneal. (40x).	73
Figura 39.	Visualización de la expresión de CK3 en células epiteliales corneales mediante microscopía de fluorescencia. A: en un ojo sano. B: en el único ojo tratado mediante inyección de ASCs donde la tinción fue positiva para CK3. En ambas fotografías las células epiteliales son positivas para este filamento intermedio y se visualizan en rojo; los núcleos, marcados con DAPI, se visualizan en azul.	73
Figura 40.	Se muestra el patrón inflamatorio de ojos tratados mediante MA-ASCs a nivel del limbo en secciones histológicas teñidas con hematoxilina-eosina a A: 3 semanas y B: 4 semanas de tratamiento. En ambos casos se observa un patrón inflamatorio moderado de tipo crónico a base de linfocitos y células plasmáticas.	75
Figura 41.	Se muestra el patrón inflamatorio de dos secciones histológicas corneales teñidas con hematoxilina-eosina en dos ojos a las 4 semanas del procedimiento. A: Patrón inflamatorio de tipo mixto y grado leve a base de linfocitos y PMN. Corresponde a un ojo tratado con MA-ASCs . Se aprecian eritrocitos extravasándose de los vasos sanguíneos. (20x). B: Patrón inflamatorio de tipo agudo y grado severo en un ojo del grupo MA (20x). C: A las 4 semanas, aunque clínicamente no se observaba la MA, microscópicamente se aprecian las células epiteliales de la misma. Corresponde a un ojo MA-ASCs.	76
Figura 42.	Visualización de la expresión de α -actina en A: limbo y B: córnea de un ojo tratado mediante MA-ASCs. Microscopía de fluorescencia. La expresión de α - actina(rojo) representa los queratocitos activados en el estroma limbar y en estroma corneal. Los núcleos marcados con DAPI pueden verse en azul. Se observa la intensa fibrosis en el estroma corneal y limbar.	78

RESUMEN / ABSTRACT

La reconstrucción de la superficie ocular por ingeniería tisular, utilizando células madre de distinta procedencia, es una modalidad terapéutica con grandes perspectivas. El tratamiento de patologías de la superficie ocular severa afectada bilateralmente pasa por el empleo de tejido alogénico, bien como trasplante de limbo o de células epiteliales expandidas para su reconstrucción. Las técnicas clásicas tienen problemas de escasez de tejido, necesidad de inmunosupresión y riesgo de rechazo.

En este trabajo de investigación aplicamos una fuente alternativa de células madre, las células mesenquimales procedentes de la fracción vasculoestromal del tejido adiposo (ASCs), usadas de forma alogénica, para el tratamiento de una superficie corneal causticada. Evaluamos la eficacia clínica, su seguridad así como el modelo de implantación más adecuado.

Para ello, realizamos un modelo de causticación corneal en ojos de conejos de raza New Zealand. A la semana de la causticación, previa epiteliectomía, se procedió en un grupo de ojos a la inyección de ASCs en los cuatro cuadrantes del espacio perilimbar; otro grupo se destinó a la inyección de suero salino en el espacio perilimbar mediante el mismo procedimiento; un tercer grupo de ojos se destinó para la aplicación de membrana amniótica y un último grupo se destinó para la administración de ASCs bajo soporte de membrana amniótica. Se procedió a la exploración clínica microscópica semanalmente y los conejos se sacrificaron a las cuatro semanas. El número de perforaciones y de calcificaciones en el grupo de ojos que recibieron ASCs fue menor. Los ojos tratados mediante inyección de ASCs presentaron un cierre del defecto epitelial más rápido que los otros grupos. A nivel histológico, el grado de fibrosis corneal fue mayor en los grupos donde se aplicaron ASCs. No encontramos cambios en el patrón inflamatorio a las cuatro semanas en ninguno de los grupos aunque el grado de inflamación fue menor en los casos donde se habían aplicado ASCs. Dos ojos del grupo tratado mediante ASCs mostraron patrón CK3, esto es, de tipo corneal, aunque el hallazgo no se correlacionó con la clínica. No se observaron efectos secundarios en los ojos tratados mediante ASCs.

En conclusión, los resultados de nuestro estudio demuestran que las ASCs aplicadas sobre una superficie corneal causticada son eficaces en evitar las complicaciones graves, aceleran el cierre del defecto epitelial y la fibrosis corneal. También han demostrado ser seguras y constituyen una alternativa terapéutica en la fase precoz de una causticación corneal.

The reconstruction of the ocular surface by tissue engineering using stem cells from different sources, is a therapeutic modality with great prospects. The treatment of severely ocular surface pathologies affected bilaterally need the use of allogeneic tissue, as limbal transplant or expanded epithelial cells. There is risk of rejection with classical techniques so immunosuppression is needed.

In this research we used an alternative source of stem cells, allogeneic mesenchymal stem cells derived from vasculostromal fraction of adipose tissue (ASCs) for the treatment of a burn corneal surface. We evaluated the clinical efficacy, the safety and the most appropriate way of ASCs administration in burn ocular surfaces.

We performed our experiments in chemically injured corneas of New Zealand white rabbits. We proceeded to the injection of ASCs in the four quadrants of perilimbar conjunctiva in one group, the second group went to saline injection in perilimbar space by the same procedure, the third group was allocated for the implementation of amniotic membrane and fourth group was used for administration of ASCs low amniotic membrane. We proceeded to clinical examination weekly and rabbits were sacrificed at four weeks. The number of perforations and calcifications was lower in those eyes which had received ASCs. Eyes treated by injection of ASCs had an epithelial defect closure faster than the other groups. Corneal fibrosis was higher in groups where ASCs were applied. No inflammatory changes in the pattern were detected at four weeks of injury although the degree of inflammation was lower in cases where ASCs were applied. We observed CK3 in two eyes treated with ASCs, although this finding was not correlated with the clinic. No side effects were observed in eyes which had received ASCs.

In summary, the results of our study point out that ASCs applied on a burn corneal surface are useful in preventing serious complications, accelerate the closure of the epithelial defect and increase corneal fibrosis. They have also proven to be safe and provide a therapeutic alternative for the early treatment of burn ocular surfaces.

INTRODUCCIÓN

1. LA SUPERFICIE OCULAR Y EL LIMBO ESCLEROCORNEAL

La superficie ocular (SO) es una unidad anatomo-funcional de diversas estructuras del ojo y sus anejos que está constituida por la película lagrimal, glándula lagrimal, párpados y tres epitelios estratificados no queratinizados: el epitelio corneal, el epitelio conjuntival y el epitelio limbal.

Desde el punto de vista funcional, la SO tiene funciones refractiva y protectora. La película lagrimal lubrica y proporciona una superficie refractiva lisa, siendo responsable de dos tercios del poder refractivo total del ojo. Las uniones estrechas de las células epiteliales proporcionan una barrera no porosa que evita que los microorganismos penetren dentro del epitelio.

1.1. ANATOMÍA DE LA CÓRNEA

El epitelio corneal es un epitelio poliestratificado escamoso no queratinizado, con un espesor que oscila entre las 50-56 μm . Está constituido a nivel central por 5-7 capas de células y se engruesa a nivel periférico hasta alcanzar 8-10 capas. Las células basales de este epitelio son células columnares con núcleo prominente y proceden de las células amplificadoras transitorias que parten del limbo esclerocorneal. Las células intermedias conforman tres filas con prolongaciones en forma de alas; estas células tienden a aplanarse conforme se acercan a la superficie, siendo sus núcleos paralelos a ésta. Las capas más superficiales son aplanadas, escamosas o apicales, la superficie externa de estas células está cubierta por pliegues y microvellosidades. Las células basales se adhieren a una membrana basal de 75 nm mediante hemidesmosomas, fijándose al estroma anterior a través de fibrillas de colágeno tipo VII a las placas de anclaje, constituidas por colágeno tipo IV, VII y laminina.

Las citoqueratinas (CK) son las proteínas que constituyen los filamentos intermedios del citoesqueleto de las células epiteliales. Su función es la de organizar la estructura tridimensional interna de las células. Se conocen 20 tipos de citoqueratinas que se dividen en dos grupos, dependiendo del tamaño y del pH, clasificándose en ácidas y pequeñas (CK9-CK20) o básicas, neutras y grandes (CK1-CK8).

Las citoqueratinas específicas del epitelio corneal son la CK3, una proteína básica de 64 KD, y la CK12, proteína ácida de 55 KD. Ambas están presentes en todas

las capas del epitelio corneal y en las capas suprabasales del epitelio limbal (Schermer, Galvin et al., 1986).

El estroma corneal mide entre 500 y 540 μm en la zona central y 700 μm en periferia. Está formado por fibras de colágeno, que en un 98% es colágeno de tipo I y en un 2% colágeno de tipo V, proteoglicanos y queratocitos. Las fibras de colágeno a nivel corneal se distribuyen en forma de láminas paralelas. Los queratocitos son fibroblastos especializados dispuestos entre estas láminas. Su función es la de sintetizar el colágeno y los proteoglicanos que conforman esta matriz. A nivel del estroma las células del sistema inmune, como células polimorfonucleares (PMN), macrófagos y linfocitos están en cantidades muy escasas y proceden de los vasos sanguíneos periféricos. En caso de inflamación estas células se ven aumentadas.

La capa más interna de la córnea lo constituye la membrana de Descemet junto con una monocapa de células endoteliales. Estas células son las responsables de mantener la hidratación óptima del estroma corneal (Figura 1).

Recientemente en el Congreso Europeo de Córnea de 2012 celebrado en Milán, Dua ha dado a conocer la identificación de una nueva capa localizada entre la membrana de Descemet y el estroma, denominándola “*Dua-layer*”, que se caracteriza por una disposición irregular de las fibras de colágeno, lo que le confiere la impermeabilidad a las burbujas de aire, con implicaciones a la hora de planificar estrategias quirúrgicas.

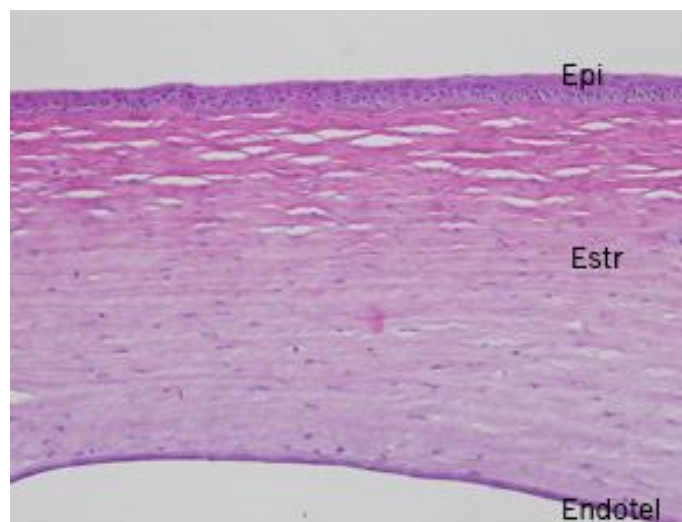


Figura 1. Estructura de la córnea en un corte transversal teñido con hematoxilina-eosina. Epi: epitelio, Estr: estroma, Endotel: endotelio.(40x).

1.2. ANATOMÍA DEL LIMBO ESCLEROCORNEAL

El limbo esclerocorneal, constituye la zona de transición entre el epitelio conjuntival columnar y el epitelio corneal escamoso estratificado (Van Buskirk, 1989). Tiene como funciones la nutrición de la córnea periférica, participar en la cicatrización corneal y proporcionar inmunovigilancia a la SO .

El epitelio limbal consta de más de 10 capas de células. A nivel basal el epitelio adquiere un aspecto ondulado con proyecciones epiteliales en el estroma subyacente dando lugar a las empalizadas de Vogt, estructura característica del epitelio limbal. La membrana de Bowman termina en un extremo redondeado en el margen central del limbo. El estroma corneal pierde su transparencia y las láminas pierden la disposición, las fibras de colágeno aumentan de tamaño y su disposición es más parecida a la que alcanzan en la esclera. Por tanto, las características del tejido limbal son intermedias entre el tejido corneal y el conjuntival (Figura 2).

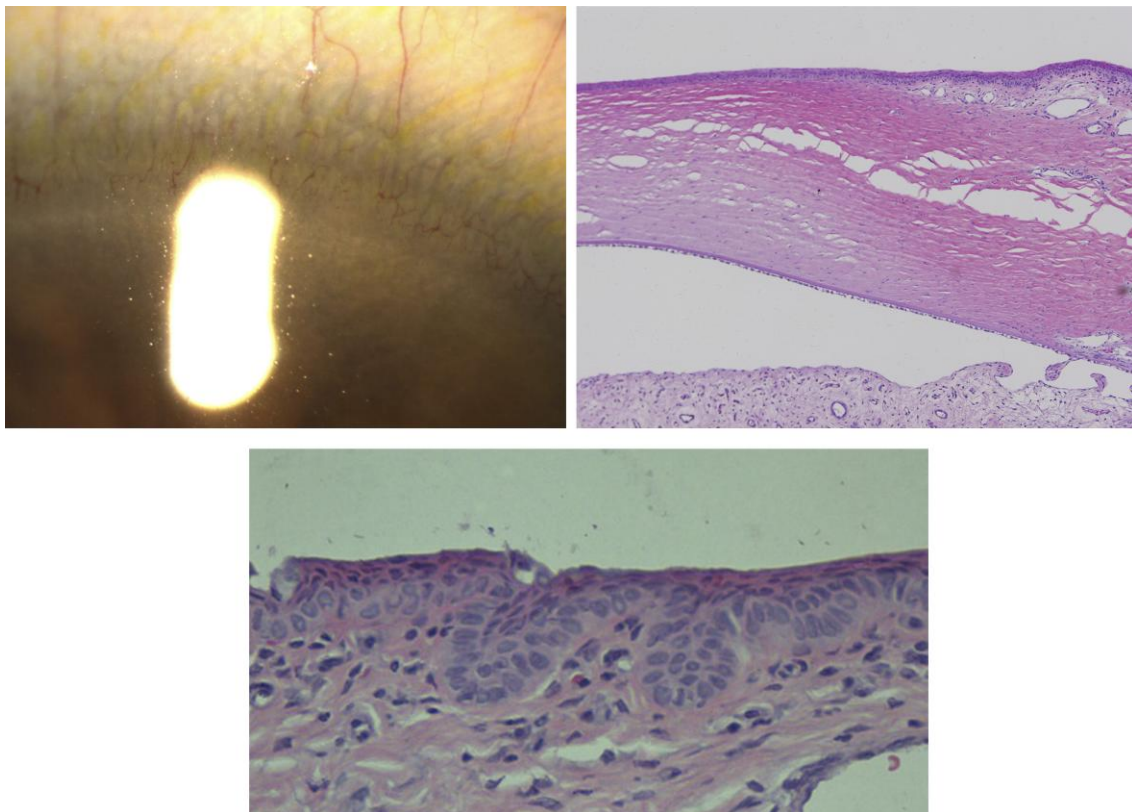


Figura 2. Anatomía del limbo esclerocorneal. A: Empalizadas de Vogt. B: Corte transversal del limbo esclerocorneal. Tinción con hematoxilina-eosina. (20x). C: Corte histológico limbar. Se muestran las criptas donde asientan las LECS (40x)

1.2.1. CÉLULAS MADRE LIMBARES

La evidencia actual sugiere que a nivel del limbo existen dos tipos de células madre: las células madre limbares epiteliales – *limbal epithelial stem cells*- (LESCs) que asientan en las regiones basales del limbo (Cotsarelis, Cheng et al., 1989, Shanmuganathan, Foster et al., 2007) y las células madre limbares mesenquimales – *limbal mesenchymal stem cells*- (LMSCs) que se localizan en el estroma limbal (Polisetty, Fatima et al., 2008).

Las LESCs están ubicadas en la estructura anatómica de las empalizadas de Vogt, que clínicamente son más evidentes en el limbo superior e inferior. Las LESCs tienen como función la de autorregenerarse, y diferenciarse a células más especializadas, siendo importante que exista un balance entre el mantenimiento y la diferenciación. Las LMSCs asientan a nivel del estroma y su papel es menos conocido; se ha hipotetizado que actuarían en el limbo a través de señales intrínsecas, regulando el microambiente o nicho de las LESCs (Zhang, Sun et al., 2010).

Las LESCs se caracterizan por la ausencia de CK3 y CK12. Están también ausentes la conexina 43 y la involucrina, marcadores también propios de estado de diferenciación corneal. Son positivas, en cambio, tanto para el factor de transcripción p63, en concreto, la isoforma $\Delta Np63\alpha$ que es más específica de LESC, como para la proteína citoplásmica ABCG2 (Schlötzer-Schrehardt and Kruse, 2005).

Las LMSCs son semejantes a las células madre mesenquimales de médula ósea (MO-MSC). Fenotípicamente expresan los siguientes marcadores de superficie: CD90, CD105, CD54, y CD106 (Dravida, Pal et al., 2005, Polisetty, Fatima et al., 2008).

Por último, en cuanto al patrón secretor, las LESCs expresan más factor de crecimiento tumoral alfa (TGF α), Factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y factor de crecimiento de fibroblastos (FGF)11, mientras que LMSCs expresan una mayor cantidad de FGF 7 y FGF 2 (Polisetty, Fatima et al., 2008).

1.2.2. EL NICHOLIMBAR

El nicho limbar es la región que proporciona el microambiente a las LESCs, les hace mantenerse bajo condiciones de homeostasis, diferenciación y les proporciona protección frente a estímulos externos. Está constituido por componentes de la matriz extracelular, distintas estirpes celulares, entre ellas LMSCs y los productos y señales que ellas secretan (Li, Hayashida et al., 2007, Secker G.A, 2009, Takács, Tóth et al., 2009) (Figura 3).

Algunos de los factores que influyen en la regulación del nicho son su proximidad a la vasculatura y la composición de la membrana basal en esta región del limbo: compuesta de isoformas específicas de colágeno tipo IV como $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 5$, a diferencia de las isoformas típicas de la membrana basal de localización corneal ($\alpha 3$ y $\alpha 5$), laminina $\gamma 3$ y fibronectina (Secker G.A, 2009).

El nicho limbal está vascularizado y altamente innervado, lo que le proporciona nutrientes y factores de crecimiento. Aunque la córnea está expuesta a oxígeno atmosférico, una característica importante es que en el nicho la tensión de oxígeno es baja, lo cual ha llevado a comprobar *in vitro* que en condiciones de hipoxia es posible mantener un mayor número de colonias de células epiteliales limbares indiferenciadas.

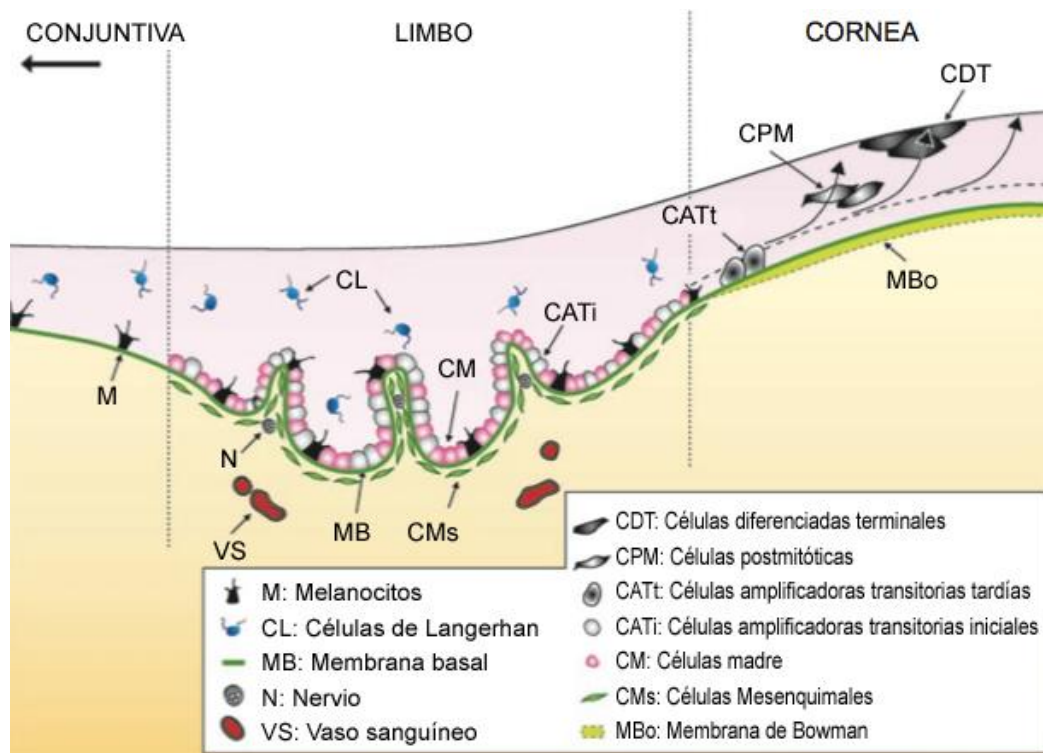


Figura 3. Esquema que muestra la composición del nicho de las células madre epiteliales limbares. Modificado de Li, Hayashida (2007).

La protección de LESC's a nivel del limbo es debida a tres factores de las empalizadas: su localización, protegida por los párpados, su disposición en interdigitaciones hacia el estroma, y la existencia de melanocitos que los protegen de la radiación ultravioleta.

Los mecanismos de control a nivel del limbo se producen mediante citoquinas y la interacción de las células con los componentes de la matriz extracelular. Li y Tseng han dividido las citoquinas del limbo en tres grupos: Tipo I, liberadas por el epitelio y

cuyos receptores se encuentran en las células estromales ($\text{TGF}\beta$, $\text{IL-1}\beta$, $\text{PDGF}\beta$). Las citoquinas tipo II y sus receptores se encuentran en células epiteliales y estromales y son IGF1 , $\text{TGF}\beta 1$, $\text{TGF}\beta 2$, bFGF). Las citoquinas tipo III son liberadas por el estroma y los receptores asientan en el epitelio, (KGF , HGF). Muchos de estos factores (KGF , HGF , NGF , $\text{TGF}\beta 1$, $\text{TGF}\beta 2$, bFGF) han sido identificados también en la membrana amniótica humana, lo cual facilita el crecimiento in vitro de LSCs (Li, Hayashida et al., 2007)

1.2.2.1. Fisiología de la regeneración corneal

Según la teoría de Thoft, las células madre limbares fenotípicamente indiferenciadas, poseedoras de una alta capacidad mitótica, proliferan lentamente y sufren un desplazamiento horizontal basal y centrípeto (Y), y se diferencian a células amplificadoras transitorias; estas células amplificadoras con capacidad limitada de proliferación, dan origen a las células basales del epitelio, que proliferan y se desplazan verticalmente, (X), diferenciándose a células postmitóticas alares. Estas últimas se diferencian a células superficiales (Z). De esta forma se estima un recambio de la superficie corneal cada 7 días (Thoft and Friend, 1983) (Figura 4).

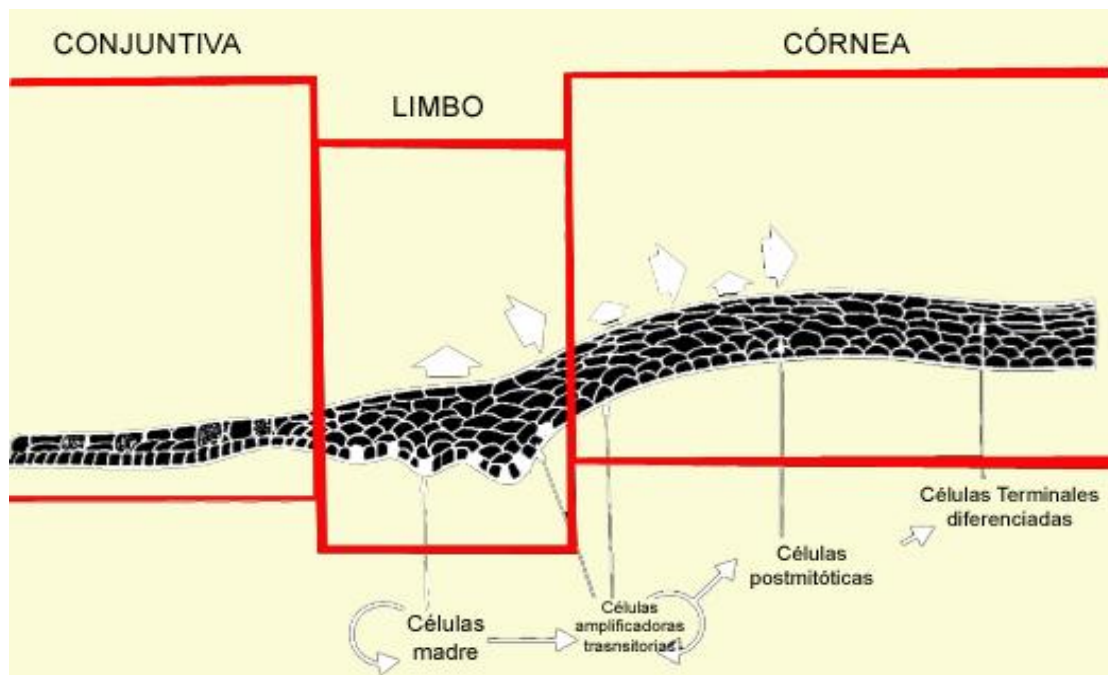


Figura 4. Esquema de la regeneración del epitelio corneal. Modificado de Schlötzer-Schrehard and Kruse, (2005)

1.3. ANATOMÍA DE LA CONJUNTIVA OCULAR

El epitelio conjuntival se extiende desde el margen posterior de los párpados cubriendo los fondos de saco, tapiza la esclera y avanza hasta el epitelio limbar.

El epitelio conjuntival consta de tres capas: A nivel basal, se compone de una monocapa de células cuboideas sobre una membrana basal. La capa intermedia está formada por células columnares y están presentes sólo en los fórnicos y en el limbo. Poco a poco las células se aplanan, acabando en un epitelio no queratinizado. Las células superficiales próximas a la conjuntiva tarsal son cuboideas y más planas en el limbo, debido a una adaptación a la presión mecánica. Las células caliciformes, también denominadas células de *goblet*, constituyen entre un 5-20% de las células epiteliales conjuntivales. Se distribuyen sobre todo por toda la conjuntiva tarsal y bulbar. La función de la célula caliciforme es la de producir mucina. La mucina tipo 5AC (MUC5AC) es producida específicamente por las células caliciformes.

El epitelio conjuntival carece de membrana basal organizada, y descansa sobre un tejido fibrovascular llamado sustancia propia o estroma. Este estroma consta de dos capas, la más superficial, con vasos linfáticos, y la más profunda, que es fibrosa. En la capa superficial hay presencia de linfocitos, la mayoría linfocitos T que interactúan con las células epiteliales a través de citoquinas y factores de crecimiento. En condiciones normales estas células son escasas, aumentando en casos de inflamación.

En el año 1995 fueron identificadas las células madre de la conjuntiva a nivel de los fórnicos conjuntivales (Wei, Cotsarelis et al., 1995).

2. AFECTACIÓN DE LA SUPERFICIE OCULAR TRAS CAUSTICACIÓN

Las causticaciones de la SO suponen un 12-19% de los traumatismos oculares (Reim, Redbrake et al., 2001), afectando a poblaciones jóvenes, en edad laboral y con frecuencia de forma bilateral.

La extensión del daño ocular depende del agente químico responsable, de su concentración y volumen, del pH, así como del tiempo de exposición. Las sustancias alcalinas por su mayor poder de penetración pueden ser devastadoras para la SO.

En general, las causticaciones corneales químicas se manifiestan en cuatro etapas: fase inmediata, fase aguda, que ocurre hasta los 7 días tras el daño, fase de

reparación inicial, entre los 7 y los 21 días y fase de reparación tardía, si acontece después de los 21 días (JP, 1987)

De cómo se maneje la fase aguda y de reparación inicial depende el pronóstico de una causticación. Los problemas fundamentales en la etapa aguda son: la lenta epitelización corneal, la úlcera corneal persistente, las perforaciones corneales y la neovascularización corneal. (Wagoner, 1997). Cuando entre los 7 y los 21 días no se ha producido la epitelización corneal completa, es posible que estemos ante un daño severo de las LESC's que daría lugar a una insuficiencia límbica.

2.1. DAÑO Y REGENERACIÓN EPITELIAL

Tras una causticación del epitelio corneal, el grado de recuperación es dependiente del movimiento centripeto del epitelio adyacente, partiendo desde el limbo (Thoft and Friend, 1983). Si los defectos corneales y limbares son extensos, el epitelio conjuntival constituye la única fuente de regeneración epitelial. Para defectos epiteliales centrales, que cierran por migración del epitelio adyacente, la velocidad de cierre es de 0,69-1,46 mm²/ hora (Jumblatt and Neufeld, 1986). Para defectos epiteliales extensos la velocidad de cierre es más rápida, debido al incremento de la actividad mitótica de las células amplificadoras transitorias, aunque el tiempo absoluto hasta el cierre completo sea mayor. (Matsuda, Ubels et al., 1985) Si lo que ocurre es una pérdida de LESC's, la conjuntiva es la única fuente de regeneración epitelial, y el tiempo de cierre es más prolongado.

La disminución de LESC's tras un modelo de causticación química es debida a dos mecanismos fundamentalmente: la destrucción directa en el momento del daño agudo o indirectamente al dar lugar a un nicho estromal limbar inadecuado. En insuficiencias límbicas generadas por gas mostaza la epitelización inicial de la córnea hace pensar que el daño inicial respeta en este modelo las LESC's y que el déficit de éstas, que ocurre fundamentalmente en la fase crónica, es debida a un microambiente inadecuado generado por la inflamación, con la consiguiente destrucción de LESC's (Kadar, Horwitz et al., 2011). El estado del estroma limbal es decisivo para el tratamiento de la insuficiencia límbica. Se sabe que la inflamación estromal intensa, asociada a enfermedad crónica, puede interferir con la capacidad de las LESC's para proliferar y diferenciarse (Tsai and Tseng, 1995).

Independientemente de la fuente de epitelio que cierre el defecto, el grado de migración tras la causticación puede ser enlentecido por la inflamación tanto limbal como corneal (Wagoner, Kenyon et al., 1984), el daño de la membrana basal (Pfister and

Burstein, 1976), y la degradación de la fibronectina de la membrana basal por el activador del plasminógeno (Granelli-Piperno, Vassalli et al., 1977)

2.2. DAÑO Y REGENERACIÓN DEL ESTROMA CORNEAL

La afectación del estroma corneal tras una causticación conlleva destrucción de los queratocitos y con ello del colágeno y la matriz extracelular. Como mecanismo compensatorio, los queratocitos incrementan las mitosis y los que resultan de ellas migran hacia la región dañada. Para que esta migración ocurra es preciso que el epitelio y la membrana basal estén íntegros.

Los fenómenos de colagenolisis se producen por el propio agente cáustico o por las colagenasas producidas por las células epiteliales y queratocitos corneales y en mayor medida por los PMN, que migran hacia la zona del daño, en concreto la Metaloproteasa (MMP) 8. En daños severos, la destrucción del colágeno puede ser completa, resultando en perforaciones corneales.

2.3. PAPEL DE LA INFLAMACIÓN EN LA CAUSTICACIÓN CORNEAL.

El factor que determina la evolución de una causticación es el grado de inflamación. La existencia de una infiltración de polimorfonucleares (PMN) en úlceras estériles y el cese de estas ulceraciones tras eliminación de las células inflamatorias de la córnea lo confirman (Kenyon, 1985). En las primeras 12-24 horas tras una causticación química, se produce una infiltración de la córnea periférica con PMN y leucocitos mononucleares procedentes de los vasos alterados en la conjuntiva, la úvea y de los tejidos necróticos de la conjuntiva bulbar y tarsal (Kenyon, Berman et al., 1979, Pfister and Burstein, 1976, Reim and Teping, 1989, Sonoda, Nakao et al., 2005, Williams, Paterson et al., 1982) en respuesta a sustancias quimiotácticas producidas por el epitelio (Pfister, Haddox et al., 1984, Pfister, Haddox et al., 1987, Pfister, Haddox et al., 1988) y el tejido estromal degradado (Pfister, Haddox et al., 1987). Los PMN comienzan su actividad fagocítica y degranulatoria (Pfister, 1983), liberando importantes enzimas como la colagenasa tipo 1 y el activador del plasminógeno (Lazarus, Brown et al., 1968). Estos PMN son también los responsables del edema corneal y la opacidad corneal inicial (Sonoda, Nakao et al., 2005).

Si la quemadura es severa, una segunda ola de células inflamatorias comienza a los siete días y dura hasta los 14-21 días, período en que se producen los mecanismos de

reparación corneal (Paterson, Williams et al., 1984). La inflamación estromal persiste mientras el defecto epitelial persiste o los tejidos conjuntivales necróticos proporcionan una infiltración inflamatoria. El retraso de la epitelización corneal por inflamación persistente, productos de degranulación de los PMN y la estimulación de las colagenasas de los queratocitos contribuyen a una digestión enzimática estéril del estroma corneal tras la segunda y tercera semana del daño.

La inflamación persistente, se explica por dos procesos: la ausencia de actividad antiangiogénica endógena propia del epitelio corneal, y la sobreproducción de TGF β .

El primer proceso lo explica la destrucción de la membrana basal epitelial. Se sabe que el epitelio corneal produce factores angiogénicos y proinflamatorios como factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) que en condiciones normales es secuestrado por la membrana basal corneal (Adamis, Mekler et al., 1991, van Setten, 1997). Además, la membrana basal es rica en factores antiangiogénicos como el inhibidor de la metaloproteasa 3 y la endostatina. La destrucción de la membrana basal produce la liberación de los factores angiogénicos secuestrados y la falta de producción de inhibidores de la angiogénesis potenciando la reacción angiogénica.

Respecto al segundo proceso, en condiciones normales TGF- β participa en el crecimiento epitelial normal y migración así como en el remodelamiento de la matriz corneal. En condiciones de déficit de células limbares existe una regulación anómala de TGF- β 1 y β 2 (Kruse and Tseng, 1994), produciéndose una inhibición dosis dependiente de la proliferación del epitelio corneal y limbar. A su vez, TGF- β induce la transformación de queratocitos a fibroblastos y miofibroblastos (Jester, Huang et al., 2002). Por último, TGF- β induce la expresión de la proteína quimiotáctica de monocitos y macrófagos tipo 1 (MCP-1) y VEGF (Abraham, Sawaya et al., 2003, Nakagawa, Li et al., 2004), potenciando la inflamación y la vascularización corneal.

A su vez, la inflamación corneal produce apoptosis de LESC residuales (Tsai and Tseng, 1995).

2.3.1. TRATAMIENTO DE LA CAUSTICACIÓN CORNEAL EN FASE INFLAMATORIA

El tratamiento antiinflamatorio en la fase inicial reduce la infiltración celular y disminuye la segunda ola inflamatoria, siendo fundamentales el tratamiento con corticoides, esteroides gestacionales, tetraciclinas y membrana amniótica. (Dursun, Kim et al., 2001).

Los corticoides reducen la infiltración de células inflamatorias y estabilizan las membranas lisosomales de los PMN. Tienen el inconveniente de interferir con la migración de queratocitos en el área del daño y la síntesis de colágeno, impidiendo la reparación a nivel estromal. Este efecto deletéreo de los corticoides es evidente a partir de los 10-14 días, donde debe haber un balance entre la síntesis de colágeno y la actividad proteolítica, para evitar el adelgazamiento y la perforación.

Donde los corticoides no deben faltar es en los primeros 7-10 días donde el riesgo-beneficio es favorable. A partir de este momento, los esteroides progestacionales tienen menos actividad antiinflamatoria que los corticoides pero un menor efecto sobre la síntesis de colágeno y reparación estromal. Su uso se aplica a partir de los 10-14 días cuando es necesaria la supresión de la inflamación, pero la interferencia con la reparación estromal corneal es indeseable.

La administración de citrato o ácido ascórbico, un quelante del calcio, disminuye los niveles de calcio intracelular de los PMN, dificultando su quimiotaxis, la capacidad fagocítica y la liberación de enzimas lisosomales en un 63% en fase precoz y en 92% en fase tardía,

La aplicación de procedimientos quirúrgicos desde etapas iniciales del daño tiene por objeto el restablecimiento de la vascularización limbar precoz para evitar necrosis ulcerativa.

Una vez superada la fase de inflamación, el objetivo debe ser regenerar la superficie de la córnea con un epitelio de fenotipo corneal. La queratoplastia sería un tratamiento diferido, una vez conseguido asegurar un limbo competente.

3. INSUFICIENCIA LÍMBICA

La destrucción o disfunción de una cantidad suficiente de epitelio limbar, y por tanto de células madre, origina un estado conocido como insuficiencia límbica, originando un fracaso en la regeneración del epitelio corneal con la resultante reepitelización a expensas de las células epiteliales conjuntivales (Dua, Saini et al., 2000).

Las consecuencias son dolor crónico por la formación de defectos epiteliales corneales y pérdida de agudeza visual por la conjuntivalización existente. El epitelio conjuntival es menos transparente y se adhiere menos al estroma corneal subyacente favoreciendo la persistencia de erosiones corneales asociadas a inflamación crónica,

neovascularización, cicatrización, ulceración y “derretimiento” o melting estromal que pueden conducir a la perforación y a la ceguera. (Dua, Saini et al., 2000)

En ocasiones la insuficiencia límbica va asociada a grados variables de inflamación aguda o crónica, que repercuten en un déficit de LESC's en grados variables que pueden no correlacionarse con los signos clínicos (Shimmura and Tsubota, 2008).

Cuando el déficit de LESC's afecta a una región del limbo, quedando indemne una población de células madre en otras áreas, se habla de insuficiencia límbica parcial, que resulta en la conjuntivalización sectorial de la córnea. Si la disfunción o destrucción afecta a la córnea completa, la conjuntivalización de la córnea afecta a 360°, denominándose insuficiencia límbica total (Figura 5).



Figura 5. *Paciente con un cuadro de Insuficiencia Límbica total tras causticación química. Se muestra la neovascularización corneal. Departamento de Córnea, Hospital Universitario La Paz.*

3.1. ETIOLOGÍA

Las causas de destrucción del limbo se incluyen en tres categorías:

1.- Destrucción traumática: Las causticaciones químicas constituyen la causa más frecuente de insuficiencia límbica, y han sido ampliamente comentadas en el apartado anterior de este trabajo. Otras causas incluyen quemaduras térmicas o por radiaciones ultravioletas, cirugías o crioterapias múltiples sobre el limbo, epiteliopatías

asociadas al uso prolongado de lentes de contacto, el empleo crónico de ciertos fármacos (como el 5-fluoruracilo) y tumores queratoconjuntivales.

2.- Destrucción inflamatoria, apreciable en el síndrome de Stevens-Johnson (SSJ), queratitis infecciosas severas, penfigoide ocular cicatricial de las membranas mucosas (POC), queratoconjuntivitis atópicas, queratoconjuntivitis límbica superior, rosácea ocular, avitaminosis A, inflamaciones corneales periféricas asociadas a infecciones, enfermedades del colágeno o úlceras de Mooren.

3.- Causas primarias: son debidas a ausencia identificable de factores externos y a un soporte estromal insuficiente, propio de enfermedades hereditarias como la aniridia, caracterizadas por un fallo de la superficie ocular progresivo en niños debido a una baja regulación del gen PAX6, encargado en la diferenciación de las células epiteliales corneales, la eritroqueratodermia congénita, queratitis en la neoplasia endocrina múltiple y esclerocórnea. En estos casos, la disfunción o pobre regulación del microambiente estromal ocasiona una pérdida gradual de la población de células madre.

3.2. DIAGNÓSTICO

3.2.1. CLÍNICO

Los signos clínicos de insuficiencia limbar incluyen la observación de pérdida de empalizadas de Vogt, la vascularización corneal periférica, la pérdida de la superficie corneal lisa propia del epitelio corneal, y la sustitución por un epitelio irregular con reflejo mateado permeable a fluoresceína, esto es, conjuntival. En ocasiones existe erosión corneal recurrente y defecto epitelial persistente, cicatrización, calcificación, ulceración, melting y perforación corneal(Dua, Saini et al., 2000).

Clínicamente el paciente sufre fotofobia, disminución de agudeza visual, lagrimeo, blefaroespasmos y erosión corneal recurrente. En ocasiones existe historia de inflamación crónica y ojo rojo. (Dua, Saini et al., 2000)

3.2.2. CITOLOGÍA DE IMPRESIÓN

La citología de impresión es una técnica que permite evaluar las células de las capas más superficiales de la superficie ocular, a través de la aplicación de papeles de filtro que se adhieren a las células superficiales y que posteriormente son procesadas por una serie de técnicas. Tiene como ventajas la posibilidad de aplicación sobre conjuntiva, córnea o limbo y que se trata de una técnica mínimamente invasiva.

La citología de impresión aplicada sobre la superficie corneal supone la herramienta más utilizada para el diagnóstico de insuficiencia límbica. Tiene utilidad tanto para el diagnóstico, como, en caso de existir, determinar si se trata de una insuficiencia límbica total o parcial y, en caso de plantear como tratamiento un trasplante limbar autólogo o expansión de limbo autólogo del ojo adelfo, confirmar si se trata de un ojo totalmente sano.

La citología de impresión en esta patología muestra la existencia de células caliciformes o de goblet sobre las capas más superficiales de la córnea (Calonge, Diebold et al., 2004, Sacchetti, Lambiase et al., 2005). En 1990 Pflugfelder adaptó las técnicas de inmunohistoquímica a la citología de impresión. A través de las inmunotinciones de citoqueratinas, es posible demostrar fenotipo corneal o conjuntival.

3.2.3. MICROSCOPIA CONFOCAL

La microscopía confocal es una prueba de imagen, no invasiva, que, a diferencia de la citología de impresión, permite evaluar el epitelio corneal en todas las capas corneales.

Al microscopio confocal, las células epiteliales corneales normales se observan como células regulares, bien definidas, de bordes brillantes y citoplasma oscuro. A nivel superficial, son más planas y el núcleo es brillante. Se diferencian de las células conjuntivales porque éstas tienen bordes menos definidos e hiperreflectivos. Además, cuando existe conjuntivalización se identifican células caliciformes y neovasos. Shortt publica una serie de casos donde utiliza la microscopía confocal como método de diagnóstico para pacientes con insuficiencia límbica (Shortt, Secker et al., 2007) (Dua, Miri et al., 2009).

4. TRATAMIENTO DE LA INSUFICIENCIA LÍMBICA

El manejo de las enfermedades severas de la superficie ocular que cursan con insuficiencia límbica continúa siendo un reto, ya que además de ser una causa significativa de morbilidad visual, e incluso de ceguera, afecta a sectores jóvenes de la población.

La insuficiencia límbica no puede ser corregida únicamente con un injerto corneal (queratoplastia penetrante o lamelar), puesto que esta técnica únicamente trasplanta células centrales sin capacidad proliferativa y de autorenovación, siendo imprescindible restaurar previamente la función limbar deteriorada para la viabilidad del

posterior trasplante corneal (Figura 6) (Maguire, Stark et al., 1994). En los casos donde la transparencia corneal central no esté comprometida, el tratamiento es la renovación del limbo corneal, sin necesidad de un trasplante de córnea.

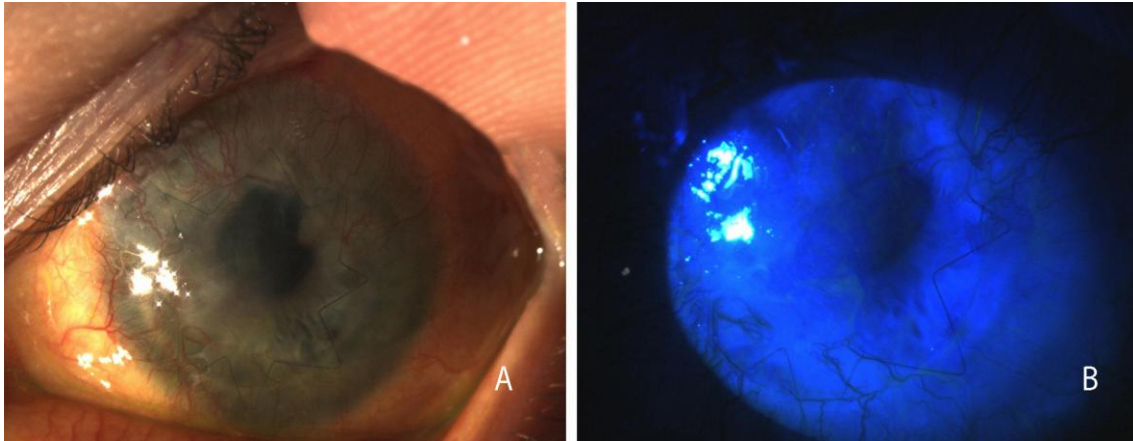


Figura 6. *Paciente con insuficiencia límbica desarrollada sobre un trasplante corneal. A: Se muestra la conjuntivalización y la neovascularización corneal sobre una queratoplastia penetrante en un paciente que padecía insuficiencia límbica total previa al trasplante de córnea. B: Conjuntivalización corneal: se muestra la irregularidad del epitelio corneal. Imagen con luz cobalto. Departamento de Córnea, Hospital Universitario La Paz.*

Actualmente las opciones terapéuticas para el déficit de LESC's incluyen el trasplante limbar alogénico o autólogo y más recientemente el trasplante de fuentes de epitelio, como los cultivos de LESC's o de mucosa oral. El trasplante de células madre de otras fuentes, entre ellas las mesenquimales constituye otra alternativa.

Independientemente de la modalidad terapéutica aplicada, previamente es clave el restablecimiento de una superficie ocular anatómicamente adecuada, corrigiendo los defectos de los párpados y conjuntiva, la sequedad ocular asociada y la inflamación subyacente.

4.1. TRATAMIENTO DE LA INSUFICIENCIA LÍMBICA PARCIAL

Cuando existe una destrucción parcial de LESC's, en caso de que no exista afectación del eje visual, la conducta debe ser menos agresiva, con lágrimas artificiales, suero autólogo y oclusión de los puntos lagrimales.

4.1.1. EPITELIECTOMÍA CONJUNTIVAL SECTORIAL E INJERTO DE MEMBRANA AMNIÓTICA

En los casos en que la conjuntivalización ocupa el eje pupilar, el tratamiento recomendado es la epiteliectomía conjuntival sectorial, para que epitelice a partir del epitelio limbar indemne, siendo necesario que exista un 25% de epitelio limbar sano para lograr una epitelización total (Dua, 1998). En el momento actual se propone como tratamiento de elección la epiteliectomía conjuntival sectorial, seguida de injerto de membrana amniótica (MA) suturada (Anderson, Ellies et al., 2001, Tseng, Prabhasawat et al., 1998), o asociada a pegamento de fibrina (Kheirkhah, Casas et al., 2008) que ofrece mejores resultados, con un tiempo medio de epitelización de 22,8 días. Esto se explica porque la MA permite la diferenciación in vivo de las LESC's sanas residuales y proporciona una membrana basal que sirve como sustrato para la epitelización.

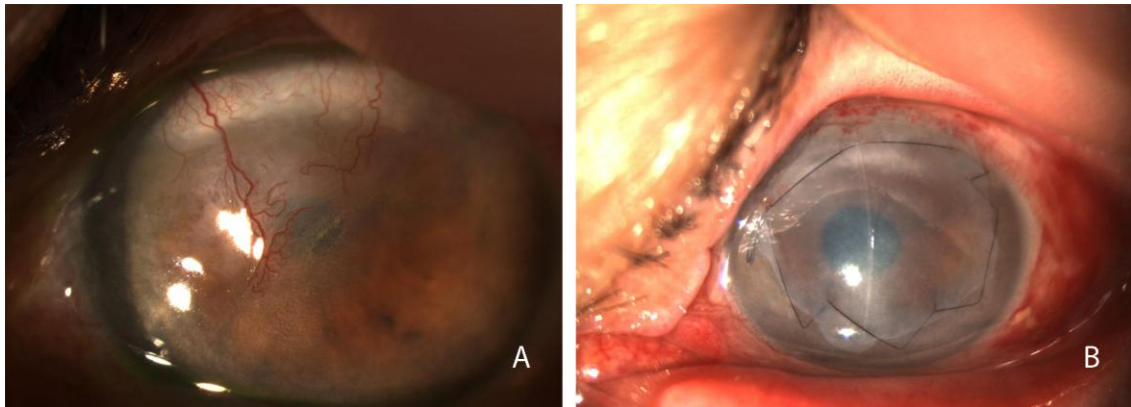


Figura 7. Paciente con insuficiencia límbica parcial y tratamiento quirúrgico empleado. A: Se muestra la conjuntivalización en un sector de la córnea, llegando a eje visual. B: Tratamiento aplicado: Se muestra el parche de Membrana Amniótica tras epiteliectomía. Departamento de Córnea, Hospital Universitario La Paz.

4.2. TRATAMIENTO DE LA INSUFICIENCIA LÍMBICA TOTAL

La técnica quirúrgica para corregir la insuficiencia límbica total lo constituye el trasplante de limbo. Si el déficit de LESC's es avanzado, el cuadro se acompaña de pérdida de transparencia corneal y obliga a la realización simultánea o secuencial de una queratoplastia penetrante o lamelar (Yao, Zhang et al., 2002). En ausencia de inflamación, el trasplante de córnea puede realizarse al mismo tiempo que el de limbo, aunque en general se recomienda esperar unos meses, dada la posibilidad de mejorar la capa epitelial sólo con el trasplante de limbo, evitando la necesidad de una queratoplastia penetrante o lamelar posterior.

4.2.1. AUTOINJERTO DE LIMBO Y CONJUNTIVA AUTÓLOGO (CLAU)

Si la insuficiencia límbica es unilateral y total, como puede ocurrir en algunas causticaciones, el tratamiento de elección es el trasplante autólogo del limbo del ojo contralateral mediante un autoinjerto limbar y conjuntival autólogo, (CLAU)

Los primeros trasplantes de limbo autólogos fueron realizados por Kenyon y Tseng en 1989, y el tamaño del CLAU del ojo adelfo era de 240° (Kenyon and Tseng, 1989). Actualmente se utilizan injertos de 90-160°, aunque la utilización de la membrana amniótica como parche puede ayudar a reducir el tamaño del CLAU donante a 60° (Liang, Sheha et al., 2009).

Aún así, se ha descrito que pueden aparecer daños irreversibles en el limbo del ojo donante aunque éste sea un ojo sano. Curiosamente, cuando estos injertos son más pequeños, surgen complicaciones en el ojo donante como haze, pseudopterigium, queratitis filamentosa, epitelio anormal, y depresión corneal (Kenyon, Berman et al., 1979) (Cauchi, Ang et al., 2008).

El CLAU, como procedimiento autólogo que es, no requiere inmunosupresión. La supervivencia del injerto disminuye con el tiempo de evolución, y oscila desde un 47%- 81,3% al año a un 68% a los dos años (Cauchi, Ang et al., 2008, Santos, Gomes et al., 2005), se cree que por agotamiento de las células madre del limbo trasplantado.

4.2.2. INJERTO QUERATOLIMBAR ALOGÉNICO (LKAL), INJERTO CONJUNTIVOLIMBAR DE DONANTE VIVO (LR-CLAL) Y QUERATOPLASTIA EXCÉNTRICA.

En insuficiencias límbicas bilaterales (causticaciones, aniridias, SSJ, POC...) el procedimiento de elección es el trasplante alogénico de limbo. En estos casos existen tres alternativas disponibles: un aloinjerto queratolimbar de donante cadáver (KLAL), un aloinjerto conjuntivo-limbar de donante vivo (lr-CLAL), o una queratoplastia lamelar excéntrica.

Básicamente, el trasplante KLAL consiste en un rodete lamelar de 360° que incluye una mínima porción de tejido escleral, el limbo completo y la porción más periférica de la córnea. En estos casos se requiere un régimen inmunosupresor prolongado con dos o más agentes inmunosupresores para prolongar la supervivencia del injerto, a pesar de lo cual existe un alto riesgo de rechazo (Ilari and Daya, 2002).

Los pacientes con insuficiencias límbicas causadas por enfermedades inmunomediadas, como el Síndrome de Stevens-Johnson o el penfigoide cicatricial ocular tienen peor pronóstico, consiguiendo la estabilidad del epitelio corneal a más largo plazo (mayor a 6 meses). En estos casos influirían en el mantenimiento del injerto otros factores como la existencia de un ojo seco, la queratinización, la inflamación crónica, y anormalidades de los márgenes palpebrales a pesar de mantener el régimen inmunosupresor.

La supervivencia del injerto queratolimbar con dos inmunosupresores varía desde el 83,9% a 3 años, al 31 % a 4 años(Cauchy, Ang et al., 2008). En caso de las queratoplastias excéntricas la supervivencia del injerto es menor del 17%(Cauchy, Ang et al., 2008).

En una rigurosa revisión de la literatura realizada por Cauchy y Azuara-Blanco,(Cauchy, Ang et al., 2008) que incluía 26 trabajos con insuficiencias límbicas que aportaban evidencia clínica con más de 15 pacientes por autor, se extraen los siguientes resultados en cuanto a procedimiento terapéutico empleado, ganancia visual y complicaciones: de 182 ojos con insuficiencia límbica bilateral, 134 ojos se trataron mediante KLAL y 48 ojos mediante queratoplastia excéntrica. Los 68 casos de insuficiencia límbica unilateral se trataron mediante CLAU. En el caso de KLAL se requirieron regímenes de inmunosupresión variable: Ciclosporina A (CyA) a dosis entre 3 mg/kg a 12 mg/kg o Azatioprina o Micofenolato Mofetil a dosis 2mg/kg día, en combinación con glucocorticoides sistémicos. Muchos estudios no dan detalle de la duración del tratamiento de inmunosupresión. Considerando éxito como la ganancia de mejor agudeza visual corregida (BCVA) de 2 líneas, la tasa de éxito varió desde el 31% al 67% en caso de KLAL y de 17% en caso de KP excéntrica, con un tiempo de seguimiento de 6,8 meses a 5 años. De un total de 68 casos de insuficiencias límbicas unilaterales donde se practicaron CLAU, entre un 35% y un 88% experimentaron ganancia de 2 líneas de agudeza visual (AV).

Entre las complicaciones tras KLAL, la AV disminuyó en 0-9% de los casos, se observó glaucoma en 19-37% de los casos , el 18% requirió cirugía filtrante, existió rechazo del injerto en 0-3% y defecto epitelial persistente 0-3% de los casos.

Tras queratoplastia excéntrica, se evidenciaron las siguientes complicaciones: 0-18% se redujo la AV, el 43% desarrolló glaucoma, en un estudio, el 32% precisó dispositivo de drenaje, si bien es cierto que formaban parte del grupo aniridia. El 29% de los estudios desarrollaron queratitis microbiana, y en un estudio se vio necrosis del injerto en 14% de los ojos.

Las complicaciones de la insuficiencia límica unilateral tras tratamiento con CLAU fueron menos frecuentes: disminuyó la AV entre 0-4% de los casos, se produjo glaucoma entre un 0-4% y se produjo pseudocámara anterior en 0-3% de los casos.

4.2.3. TERAPIA CELULAR. EXPANSIÓN EX VIVO DE CÉLULAS MADRE

La supervivencia limitada de los injertos de limbo autólogos, junto a la escasa disponibilidad del tejido límico impulsó a la investigación de otras fuentes de tejido donante capaz de transferir células madre sin poner en peligro la integridad del ojo donante. Además, en casos de insuficiencia límica bilateral, la posibilidad de utilizar una fuente autóloga de células madre extraocular capaz de restaurar el epitelio corneal dañado evitaría la necesidad de la inmunosupresión que requiere el trasplante de limbo heterólogo.

Finalmente, se necesitaría una técnica capaz de restaurar la función límica con el mínimo tejido donante, para poder repetir el procedimiento en caso de agotamiento del limbo trasplantado.

4.2.3.1. Expansión ex vivo de células madre limbares (CLET) autólogas y alogénicas

La expansión ex vivo de células madre, basada en el trabajo pionero en 1975 de Rheinwald y Green en piel (Rheinwald and Green, 1975), consiste en extraer células madre autólogas o heterólogas a partir de pequeños explantes de 2x2 mm del limbo del ojo sano, y depositarlas sobre un sustrato, de forma que proliferen y formen una lámina estratificada de células epiteliales corneales. La lámina formada se trasplanta finalmente al ojo dañado. Este tipo de ingeniería corneal al ser autóloga, disminuye el riesgo de rechazo.

A pesar que el empleo de las células madre epiteliales limbares cultivadas ex vivo en humanos para tratar la insuficiencia límica se viene realizando desde hace 14 años, con los primeros trabajos de Pellegrini en 1997 (Pellegrini, Traverso et al., 1997) y que desde entonces hasta 2010 existen en la literatura 28 artículos publicados donde se han practicado expansión de células limbares a un total de 583 pacientes, el tratamiento de la insuficiencia límica sigue siendo un reto, sobre todo en casos de bilaterales.

Con el objetivo de conseguir el cultivo más adecuado se han utilizado una amplia variedad de tipos de sustratos para la expansión de LESC: MA (Grueterich, Espana et al., 2003, Shimazaki, Aiba et al., 2002), fibrina (Rama, Bonini et al., 2001),

lentes de contacto (Di Girolamo, Bosch et al., 2009) o sustratos termosensibles como PIPAMm entre otros (Higa and Shimazaki, 2008).

La supervivencia del autoinjerto tras expansión ex vivo es de un 76% frente al 45% en los aloinjertos expandidos (Baylis, Figueiredo et al., 2011, Shortt, Secker et al., 2007). Los trasplantes que fracasan lo hacen habitualmente en los primeros 2 años permaneciendo la tasa de supervivencia constante a partir de ese momento (Baylis, Figueiredo et al., 2011) . Los pacientes tratados por quemaduras químicas o térmicas presentan mayor tasa de éxito que el tipo penfigoide ocular o Síndrome de Stevens-Johnson. Es posible reintentar el procedimiento de CLET con MA en aquellos ojos donde el epitelio trasplantado previamente pierde su transparencia, obteniendo resultados satisfactorios (Nakamura, Koizumi et al., 2003).

En el momento actual, algunos laboratorios están trabajando para aumentar la tasa de éxito de CLET actuando sobre varios factores:

1.- Criterios de selección del ojo donante: El principal valor predictivo de la calidad de un injerto lo constituye la evaluación del número de holoclones. (Pellegrini, Rama et al., 2009). Concretamente, es necesario que los cultivos contengan más del 3% de células limbares p63 bright, esto es, que tiñen intensamente p63, para alcanzar una probabilidad de éxito del 78%. Sólo un 11% de los cultivos que contengan menos del 3% de este tipo de células evolucionarán favorablemente (Rama, Matuska et al., 2010)

2.- Condiciones de la superficie ocular: Los fórnicos, los párpados y el síndrome de ojo seco debe ser tratado antes de indicar procedimientos sobre el limbo.

3.- Método de cultivo: Se ha visto que los cultivos realizados a partir de explantes celulares tienen una tasa de éxito del 50% frente al 73% que proceden de suspensión celular (Shimazaki, Higa et al., 2007) .

4.- Indicación quirúrgica: El pronóstico es superior en pacientes tratados por causticaciones o quemaduras térmicas frente a pacientes con penfigoide ocular cicatricial o síndrome de Stevens-Johnson, quizás porque la enfermedad conjuntival o limbal cree un microambiente adverso en las células trasplantadas. Pauklin, encontró supervivencias del injerto autólogo expandido del 75% vs 33% en aloinjertos en quemaduras o 50% en aniridia con un tiempo de seguimiento 28,5 meses (Pauklin, Fuchsluger et al.).

5.- Tiempo de seguimiento: los fallos del injerto en caso de expansión ocurren 1 ó 2 años tras la cirugía y después se mantienen constante (Shortt, Secker et al., 2007).

Aunque los trasplantes de limbo alogénicos han demostrado un aumento en la supervivencia de los injertos límbicos con el empleo de inmunosupresores, en los trasplantes de células limbares cultivadas ex vivo se plantean varias incógnicas a raíz de los descubrimientos de Daya (Daya, Watson et al., 2005) que analizando el genotipo de las células epiteliales expandidas ex vivo y trasplantadas, encontró el genotipo del ADN del huésped y no el del donante alogénico, planteando distintos interrogantes: ¿eliminaría esto, por tanto, la necesidad de inmunosupresión en receptores de injertos limbares alogénicos expandidos? ¿cuáles son las células auténticamente responsables de la epitelización de la SO dañada: las células trasplantadas, o las escasas células madre del receptor, renovadas y estimuladas por las células madre trasplantadas que favorecen un nuevo nicho?

4.2.3.2. Trasplante de láminas de epitelio mucoso oral cultivado autólogo (COMET)

El trasplante de láminas de epitelio mucoso oral autólogo cultivado fue desarrollado como una alternativa al KLAL o CLET alogénico, para la reconstrucción de una superficie ocular inestable en pacientes con insuficiencias límbicas bilaterales.

Nakamura y Kinoshita, en 2003, fueron los primeros en investigar la posibilidad de reconstruir la superficie ocular mediante este procedimiento (Nakamura and Kinoshita, 2003). El análisis de la estructura de las membranas mucosas cultivadas, mostraba la existencia de las citoqueratinas propias de la mucosa oral como CK4, CK13 así como de CK3, esta última propia también del epitelio corneal maduro, pero no de CK12. Resulta poco claro si estas láminas de epitelio oral cultivadas contienen células madre (Nakamura and Kinoshita, 2003).

En la evaluación de los resultados, pese a que Nakamura observó ganancias de AV en 2 líneas en el 95% de los pacientes, los defectos epiteliales persistentes durante el seguimiento a 5 años ocurrían en el 37% de los pacientes, los problemas de hipertensión ocular en un 15% e infecciones en 5% (Nakamura, Takeda et al., 2011). La superficie ocular permanecía estable mediante este procedimiento en el 59% de los casos a 2 años y del 53,1 % a 3 años (Kawakita, Kawashima et al., 2007, Satake, Higa et al., 2011).

Se ha demostrado tras COMET un mayor riesgo de neovascularización corneal (NVC) periférica en los injertos de mucosa oral, que comienza en el primer mes postrasplante, alcanzan su punto álgido entre el 3º y 6º mes, para después disminuir gradualmente. Esta NVC se explica por la necesidad de la mucosa oral de tener un

soporte vascular para su mantenimiento. La NVC puede reducir la agudeza visual por aumento de permeabilidad vascular y opacidad (Inatomi, Nakamura et al., 2006).

Pese a que COMET añade la ventaja de evitar la inmunosupresión como tejido autólogo que es, este procedimiento no puede utilizarse en enfermedades de la SO inmunomediadas como el Síndrome de Stevens Johnson o el Penfigoide de membranas mucosas, ya que pueden existir antígenos en la membrana basal de la mucosa oral.

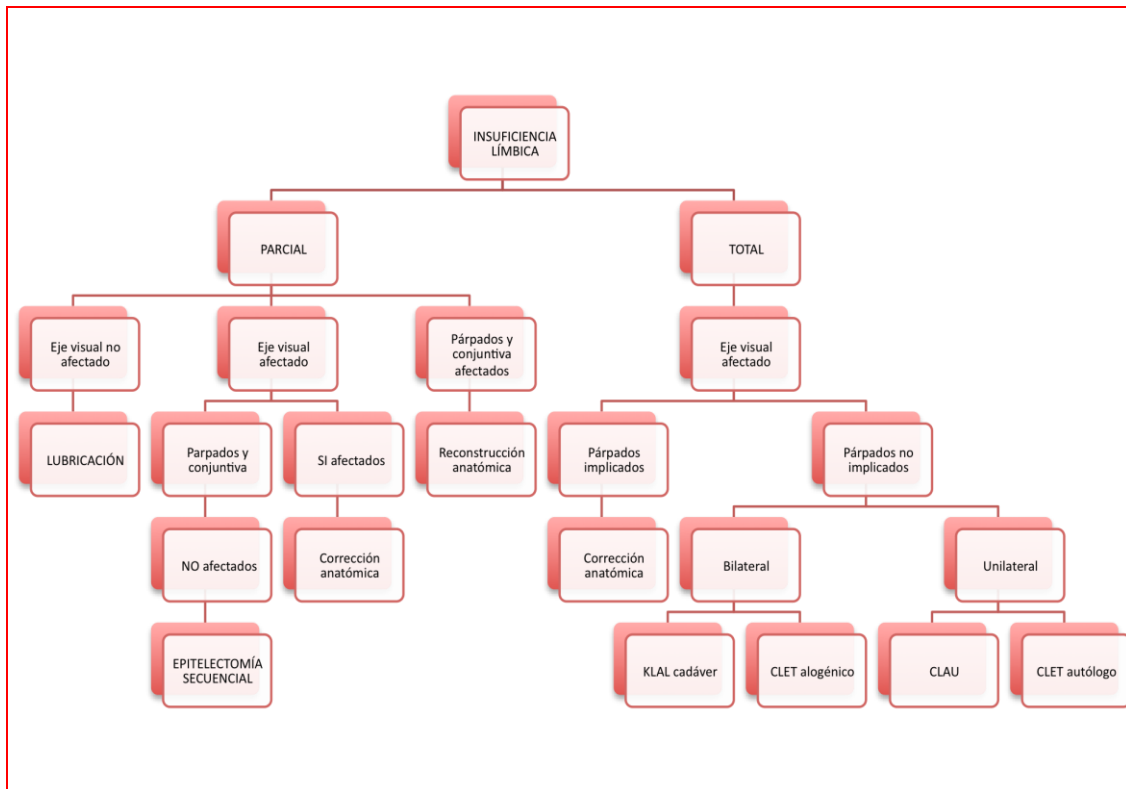


Figura 8. Algoritmo terapéutico de la Insuficiencia Límbrica. KLAL: injerto queratolimbar alogénico, CLAU: Autoinjerto limbar conjuntival, CLET: Expansión ex vivo de células madre limbares. Modificado de Dua y Miri (Dua, Miri et al., 2010).

5. CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES

Las células madre mesenquimales (MSCs) constituyen una población celular heterogénea con capacidad de pluripotencialidad y diferenciación a líneas celulares mesodérmicas y no mesodérmicas, incluyendo osteocitos, adipocitos, condrocitos, miocitos, cardiomiocitos, fibroblastos, miofibroblastos, células epiteliales y neuronas.

Las MSCs fueron descubiertas por Friedenstein hace más de cuarenta años. (Friedenstein, Piatetzky-Shapiro et al., 1966). Friedenstein y colaboradores aislaron en médula ósea una población celular distinta de las células madre hematopoyéticas,

caracterizadas por la capacidad de adherirse al plástico cuando se cultivaban *ex vivo*, de actuar como unidades formadoras de colonias fibroblásticas y de diferenciarse en múltiples líneas como hueso, cartílago y células adipocitos en particular. La Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) estableció a posteriori un cuarto criterio para considerar una célula como MSC: la expresión de los marcadores de superficie: CD73, CD90, CD105 y CD44, así como la ausencia de los marcadores CD45, CD11b y CD14, CD19, CD79 y HLA DR (Dominici, Le Blanc et al., 2006).

En cuanto a su origen, se cree que las MSCs son células que derivan del mesodermo, sin embargo, un estudio demostró que podrían derivar de células de la cresta neural (Takashima, Era et al., 2007).

Aunque las MSCs se aislaron primariamente en médula ósea, también se encuentran en otras localizaciones como tejido adiposo, periostio, membrana y líquido sinovial, músculo esquelético, dermis, decidua dental, pericitos, hueso trabecular, cartílago articular, sangre periférica, cordón umbilical, placenta, tejidos fetales, hígado, bazo y timo. (Liu, Zhuge et al., 2009)

Además de las capacidades de diferenciación en distintas líneas celulares, lo que las convierte en un blanco perfecto para su aplicación clínica, las MSCs tienen función inmunomoduladora (García-Gómez, Elvira et al., 2010, Götherström, 2007, Jones and McTaggart, 2008, Noël, Djouad et al., 2007) y presentan inmunoprivilegio, por carecer de MHC-II y expresar bajas concentraciones de MHC-I. Son por tanto poco inmunogénicas y permiten la posibilidad de realizar trasplantes sin riesgo de rechazo (García-Gómez, Elvira et al., 2010).

5.1. CÉLULAS MADRE DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO (ASCs)

En el año 2001 se describió que el tejido adiposo humano, concretamente la fracción vascular estromal, contenía una población de células de aspecto fibroblástico capaz de proliferar y diferenciarse en múltiples líneas celulares, características propias de las células troncales o células madre (Zuk, 2010, Zuk, Zhu et al., 2002). El conjunto de estas células se conoció como células regenerativas derivadas del tejido adiposo o de la fracción vascular estromal. En el año 2004 fueron definidas como ASCs (*Adipose-derived Stem Cells*), con las cuatro propiedades típicas de células madre mesenquimales comentadas: 1.-células con morfología fusiforme que se aíslan mediante digestión enzimática y adhesión a la superficie de plástico. 2.- Capacidad de autorrenovación durante largos períodos de tiempo. 3.- Multipotencialidad (diferenciación a condrocitos,

adipocitos y osteocitos). 4.- Marcaje de membrana positivo para CD29, CD44, CD90 y CD105 y negativo para CD34, CD45 y CD133.

Existen otros marcadores en la superficie de las ASCs, como oct-4, Rex-1 o Sox-2 que son propios de células madre embrionarias .

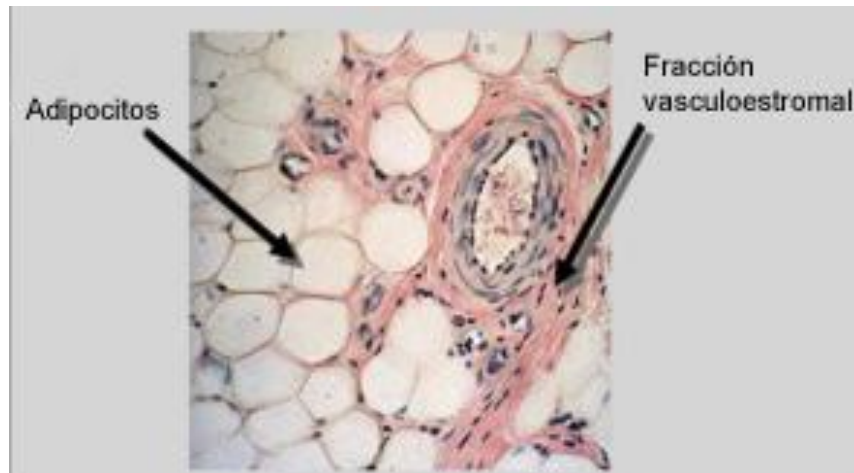


Figura 9. Esquema que muestra la grasa y la fracción vasculoestromal donde se encuentran las células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo.

A lo largo de los años estas células han recibido distintos nombres: ADAS (*adipose-derived adult stem cells*), ADSC (*adipose derived stem cells*), ATSC (*adipose tissue stem cells*), MADS (*multipotent adipose-derived stem cells*) y ASC (*Adipose Stem cells*). En el año 2004, en el Congreso internacional de IFATS (*International Federation for Adipose Therapeutics and Science*) se decidió unificar las diferentes nomenclaturas, adoptando el nombre final de ASCs.

Las ASCs han demostrado la capacidad de diferenciación a células de su misma lámina embrionaria, esto es mesodérmica; diferenciación a adipocitos (Ogawa, Mizuno et al., 2004), osteocitos (Halvorsen, Wilkison et al., 2000), condrocitos (Erickson, Gimble et al., 2002, Zuk, Zhu et al., 2001), células de músculo esquelético (Di Rocco, Iachininoto et al., 2006, Lee and Kemp, 2006, Zuk, Zhu et al., 2001) y cardiomiocitos (Fraser, Schreiber et al., 2006, Gaustad, Boquest et al., 2004). O de distinta lámina embrionaria: células nerviosas (Safford, Hicok et al., 2002, Safford, Safford et al., 2004), células endoteliales vasculares (Miranville, Heeschen et al., 2004, Rehman, Traktuev et al., 2004), células epiteliales (Brzoska, Geiger et al., 2005), hepatocitos (Seo, Suh et al., 2005) y células pancreáticas (Timper, Seboek et al., 2006).

Al igual que las MSCs aisladas de médula ósea, (MO-MSCs) las ASCs tienen acción inmunomoduladora, (Puissant, Barreau et al., 2005, Rasmusson, 2006) y

antiinflamatoria (González, Gonzalez-Rey et al., 2009) Se ha comprobado que utilizados en modelos inflamatorios de Artritis Reumatoide, Colitis intestinal (García-Olmo, García-Arranz et al., 2003) o anastomosis traqueales (Georgiev-Hristov, García-Arranz et al., 2012) disminuyen el proceso inflamatorio y controlan la respuesta de las células T. Por estas propiedades, al igual que las MSCs de médula ósea, las ASCs se pueden utilizar en el tratamiento y profilaxis de enfermedad de injerto contra huésped (Fang, Song et al., 2007, Fang, Song et al., 2006, Puissant, Barreau et al., 2005, Yañez, Lamana et al., 2006).

Actualmente el efecto terapéutico de las ASCs está siendo testado en un gran número de ensayos clínicos, En una búsqueda en *ClinicalTrials.gov* en Diciembre de 2011 con el término *adipose stem cells*, existían un total de 42 ensayos clínicos a nivel mundial utilizando estas células para la regeneración y/o reparación de tejidos. De ellos, sólo dos trabajos habían concluido ya la fase III, demostrando su aplicabilidad en la fistula perianal y en las úlceras por decúbito (García-Gómez, Elvira et al., 2010).

En una comparativa entre las MSCs de médula ósea, y las ASCs, éstas poseen capacidades semejantes a las células mesenquimales de médula ósea y tienen como ventajas en cuanto a su obtención, que se trata de un procedimiento de fácil acceso, escasa iatrogenia y alto rendimiento por la cantidad de MSCs aisladas en la extracción, evitando procedimientos de expansión muy largos con los riesgos que ello conlleva sobre el material genético (Gronthos, Franklin et al., 2001)(Tabla 1).

	MO-MSCs	ASCs
CANTIDAD TEJIDO DONANTE	Menos abundante	Más abundante
ACCESIBILIDAD	Poco accesible(Hueso)	Muy accesible (subcutáneo)
TÉCNICA DE EXTRACCIÓN	Precisa anestesia general	Anestesia local o regional
CARACTERÍSTICAS CELULARES	Misma potencialidad, capacidad replicativa...	Misma potencialidad, capacidad replicativa

Tabla 1. Se compara el rendimiento en cuanto a la fuente de extracción de células madre mesenquimales procedentes de médula ósea (MO-MSCs) o de tejido adiposo (ASCs).

5.2. USO DE CÉLULAS MESENQUIMALES EN PATOLOGÍA OCULAR. ESTADO ACTUAL DEL TEMA.

Los tratamientos que existen actualmente para la insuficiencia límbica total han demostrado que los trasplantes de células madre autólogas, tanto de limbo como de células epiteliales limbares cultivadas son una buena solución. Sin embargo los trasplantes alogénicos no han demostrado resultados satisfactorios. Por este motivo, es importante buscar otras fuentes de células madre autólogas que regeneren la superficie ocular de pacientes con déficits bilaterales donde es imposible conseguir células límbicas autólogas.

En este sentido, desde 2006 varios grupos comienzan a trabajar con MSCs provenientes de médula ósea, de bulbo piloso o decidua dental como tratamiento de la patología de la superficie ocular aprovechando la capacidad de regeneración y diferenciación de estas células, así como su habilidad para expandirse.

Varios estudios han demostrado los siguiente efectos de MSCs aplicados sobre la SO en modelos animales:

1.- Efecto antiinflamatorio: Es posible demostrar un efecto antiinflamatorio cuando la aplicación de MSCs se produce tempranamente(Oh, Kim et al., 2008). Este efecto de las MSCs se produce a través de mecanismos paracrinos (Oh, Kim et al., 2009), por aumento de citoquinas antiinflamatorias: Interleukina (IL)10 y TGF- β o disminución de las citoquinas inflamatorias: IL-2 e INF- γ (Oh, Kim et al., 2008, Oh, Roddy et al., 2010).

2.- Efecto sobre la angiogénesis corneal: El papel sobre la angiogénesis corneal resulta controvertido. Es conocido el efecto innato de MSCs sobre la angiogénesis en tejidos no oculares. La administración intravenosa de MSCs en conejos con modelo de quemadura corneal estimula la NVC a los 14 días de la inyección de MSC. Los mecanismos responsables podría ser la diferenciación de las MSCs implantadas a células endoteliales. Algunos autores publican efecto antiangiogénico tras la aplicación de MSCs sobre la superficie corneal, y lo atribuyen a un aumento en la secreción de trombospondina 1 (TSP-1), poderoso antiangiogénico y disminución de la MMP-2, que tiene efecto angiogénico (Oh, Kim et al., 2008). Esto podría significar que las MSCs se comportan de manera diferente aplicadas en la SO, cobrando importancia el microambiente que rodea a estas células.

3.- Papel en la diferenciación:

A nivel estromal las ASCs inyectadas sobre el estroma corneal se diferencian a queratocitos funcionales (Arnalich-Montiel, Pastor et al., 2008).

A nivel epitelial surge la cuestión si, como ocurre en mucosa oral, las MSCs no se diferencien a células epiteliales, esto es, a otra línea celular diferente del origen mesodérmico, a pesar de obtener un epitelio transparente e íntegro (Ma, Xu et al. 2006) (Reinshagen, Auw-Haedrich et al. 2009), o que por el contrario exista transdiferenciación a tejido epitelial corneal (Gu, Xing et al., 2009, Jiang, Cai et al.) En este sentido, el papel del nicho, bien mediante señales extrínsecas o intrínsecas, jugaría un papel importante en la diferenciación corneal. Estudios in vitro mediante sistemas transwell de cocultivos que imitan el microambiente celular in vivo, evitando el contacto célula-célula, y sí permitiendo el contacto a través de citoquinas demuestran que las citoquinas producidas por el estroma forman un microambiente que promueve a MSCs a diferenciarse a epitelio corneal (Gu, Xing et al., 2009, Jiang, Cai et al.).

Tras lo expuesto en esta introducción queda claro que el pronóstico del daño ocasionado por una causticación en la superficie ocular depende de la extensión del daño sobre las células madre epiteliales limbares.

Es crucial, por tanto, actuar en la fase aguda de la causticación mediante procedimientos que actúen inhibiendo la inflamación y minimicen el daño sobre el nicho. Si a su vez actuamos implementando células madre que podrían diferenciarse a células epiteliales corneales o estimular a las células madre limbares remanentes, el manejo en la reconstrucción de la superficie ocular dañada se vería muy beneficiado.

Las ASCs han demostrado cumplir estas propiedades cuando se emplean en otros tejidos. A nivel ocular sólo existen estudios de este tipo celular aplicados sobre la regeneración estromal. Ventajas como su accesibilidad, posibilidad de implantación mediante aloinjertos y la carencia de inmunogenicidad les hace una alternativa muy atractiva en el tratamiento de la causticación corneal aguda.

Basados en estas reflexiones, nos planteamos esta tesis doctoral.

OBJETIVOS

Hipótesis principal:

Las células madre alogénicas derivadas del lipoaspirado (ASCs) aplicadas sobre la superficie ocular en un modelo de causticación corneal durante la fase aguda, promueven la regeneración epitelial, disminuyen la inflamación y minimizan las complicaciones propias de esta fase.

Hipótesis nula:

Las ASCs utilizadas de forma alogénica en un modelo experimental de causticación corneal, aplicadas sobre la superficie ocular en la fase aguda, no producen efecto sobre la inflamación, la epitelización corneal o las complicaciones propias de esta fase.

Objetivo principal:

Evaluar la eficacia y seguridad de las ASCs en el tratamiento agudo de la causticación corneal y de la queratopatía secundaria a insuficiencia límbica.

Para la consecución de este objetivo se estudiaron diferentes variables como el defecto epitelial y la neovascularización corneal así como la celularidad inflamatoria, la fibrosis y el tipo de epitelio generado.

Objetivos secundarios:

Evaluar dos vías de administración: la inyección de ASCs vs ASCs aplicadas sobre un sustrato de membrana amniótica.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. MODELO EXPERIMENTAL DE INSUFICIENCIA LÍMBICA

1.1. MODELO EXPERIMENTAL DE INSUFICIENCIA LÍMBICA GENERADO POR AGRESIÓN QUÍMICA.

El trabajo con animales se acogió a la normativa vigente RD 223/1998 sobre protección de los animales utilizados para experimentación y fue aprobado por el Comité Ético de Bienestar animal del Hospital Universitario La Paz.

Se utilizaron 16 conejos albinos adultos de raza New Zealand (*oryctolagus cuniculus*) de peso medio 2.200 gramos, crecido en la granja San Bernardo, en España. Los conejos fueron anestesiados mediante inyección intramuscular de ketamina (20 mg/kg) y xilacina (0,1 mg/kg), oxigenoterapia 100% y gas fluorano hasta 1,5-2 %, complementado con anestesia tópica ocular (lidocaína 2%).

El daño ocular se generó en ambos ojos colocando sobre la superficie ocular un disco de gasa de un diámetro de 15 mm saturado con NaOH 1M, durante 10 segundos, seguido de un lavado profuso con 40 ml de suero fisiológico.

Tras la intervención se administró como analgésico sistémico inyección intramuscular de tramadol a dosis de 8 mg/kg cada 12 horas durante 48 horas.

1.2. CARACTERIZACIÓN DEL DAÑO: CITOLOGÍA DE IMPRESIÓN.

A la semana del procedimiento lesivo, la superficie corneal dañada aparecía recubierta por neovasos y/o tejido conjuntival, reproduciendo la situación de una insuficiencia límbica.

En este momento realizamos cuantificación y evaluación del daño basal mediante microscopía y fotografía digital.

Tras ello, se realizó citología de impresión corneal, con el objeto de confirmar el diagnóstico de insuficiencia límbica.

La citología de impresión se realizó por aposición sobre la superficie corneal de papel de filtro milipore HAWP304 (0,4 μ m) durante 20 segundos en la mitad superior e

inferior tras instilación de colirio anestésico en una combinación fija: oxibuprocaina 4mg/ml y tetracaína 1mg/ml (colirio anestésico doble®, Alcon, España). Las muestras se embebieron en paraformaldehído al 4% para su fijación. Una vez fijadas, se tiñeron con PAS-hematoxilina de acuerdo con el protocolo de Locquin y Langeron modificado por Rivas et al (Rivas, Oroza et al., 1991). Posteriormente, se observaron con el microscopio óptico para identificar existencia de células caliciformes o de goblet y el grado de metaplasia escamosa. Para el estudio de estas células se trabajó a 40 aumentos sobre fotografías de 10 x 15 cm. Se empleó un equipo de análisis de imagen compuesto por un microscopio Nikon Ophtiphot2 dotado de equipo fotográfico Microflex-DX y de una videocámara en color EVI-100011P, acoplada al monitor Sony Black Trinitron KT-14 CPq. El sistema está basado en el software IPP-Plus de imagen Pro/Media Ciermetics y el sistema CAD. Para el estudio de metaplasia escamosa se utilizó la clasificación propuesta por Murube y Rivas para la insuficiencia limbar (López-García, Rivas Jara et al., 2007, López-García, Rivas et al., 2006, Murube and Rivas, 2003) (Tabla 2).

CLASIFICACIÓN DE LA METAPLASIA ESCAMOSA DEL EPITELIO CORNEAL	
Grado 0	Células corneales pequeñas y unidas (tamaño medio 300-350 μm^2) con una ratio n:c de 1:3 y citoplasma eosinófilo. Núcleo redondo sin alteraciones
Grado 1	Células ligeramente mayores (300-400 μm^2) con n:c de 1:4, unidas pero separadas ligeramente y citoplasma eosinófilo. Núcleos sin alteraciones
Grado 2	Células mayores (500-1000 μm^2), n:c de 1:8, moderadamente separadas con citoplasma eosinófilo y núcleos binucleados ocasionalmente
Grado 3	Células mayores (1000-1800 μm^2) con n:c 1:15, frecuentemente aisladas con citoplasma metacromático y núcleo con alteraciones (binucleado, picnótico o anucleado)
Grado 4	Células muy grandes (1800-2500 μm^2), n:c 1:20, siempre aisladas con citoplasma basófilo, algunas veces con queratinización moderada, y núcleos alterados, picnóticos o anucleados.
Grado 5	Células >2500 μm^2 , n:c 1:30, siempre aisladas, citoplasma basófilo, queratinización moderada-severa y núcleos alterados líticos o anucleados.

Tabla 2. *Clasificación de los grados de metaplasia escamosa del epitelio corneal mediante citología de impresión. La evaluación se realiza en función del tamaño de las células, de la relación entre el tamaño del núcleo (n) y su citoplasma (c), y de las características de los núcleos.*

1.3. PREPARACIÓN DEL DONANTE Y ESTRATIFICACIÓN DE LA MUESTRA.

1.3.1. PREPARACIÓN DEL DONANTE

A la semana del daño se realizó desepitelización corneal y liberación de la conjuntivalización corneal mediante cuchillete de 22,5 y escarificador corneal.

1.3.2. ESTRATIFICACIÓN DE LA MUESTRA. GRUPOS EXPERIMENTALES

Una vez desepitelizado, se dividió la muestra (16 conejos, n=32 ojos) en los siguientes grupos: grupo destinado a procedimiento inyección de ASCs (Iny-ASCs) (n=8 ojos izquierdos), grupo destinado a inyección de Suero Salino (Iny-SS) (n=8 ojos derechos), grupo destinado a aplicación de ASCs sobre MA (MA-ASCs) (n=8 ojos izquierdos) y grupo de aplicación de membrana amniótica (MA) (n=8 derechos).

2. AISLAMIENTO, CULTIVO Y CARACTERIZACIÓN DE ASCs.

Las células mesenquimales se obtuvieron del tejido adiposo de la región inguinal de tres conejos de la misma raza y estirpe que los utilizados en el estudio.

Las muestras de tejido adiposo se dividieron en pequeños fragmentos y se digirieron con colagenasa tipo I (0,075%, Gibco BRL), durante 30 minutos a 37°C. A continuación se procedió a la inhibición de la acción de la colagenasa sobre el tejido digerido mediante suero fetal bovino (SFB) y posteriormente lavado con PBS varias veces y posterior centrifugado a 300 g durante 10 minutos. El pellet obtenido se pasó a través de un filtro de nylon de 70 µm.

Las células obtenidas del procedimiento anterior fueron depositadas en placas de cultivo a 37°C y 5% de CO₂, y sembradas con medio Dulbecco (DMEM) (Gibco BRL), el cual contenía 10% de SFB (Gibco BRL), y 1% penicilina-estreptomicina (Gibco BRL). El medio de cultivo fue recambiado para eliminar las células no adherentes a las 24 horas tras el sembrado y después cada cuatro días. Para los subcultivos, las células se despegaron con tripsina al 0,05% (Sigma, Saint Louis, Missouri, USA), en PBS, cuando alcanzaban el 80-90% de confluencia.

La caracterización de ASCs se llevó a cabo en dos etapas: 1º) mediante el análisis de los marcadores de superficie CD90, CD44, CD34, CD 45 y HLA-DR y 2º) mediante diferenciación a tejido osteogénico y adipogénico.

Para la determinación de los marcadores de superficie, los anticuerpos que se utilizaron fueron CD90, CD 44, CD34, CD45 y HLA-DR. Las células fueron analizadas por citometría de flujo de tres láseres Beckman Coulter Navios (Fullerton, CA, USA) tras la tinción con anticuerpos monoclonales conjugados con APC en el caso de CD90 y HLA DR, o con PE en el caso de CD44. El resto de anticuerpos: CD34 y CD45 fueron marcados con secundarios conjugados con AlexaFluor 594. La adquisición y análisis de datos se produjo usando el programa informático CELLQuest PRO (BC Biosciences).

En cuanto a la diferenciación de las células a **linaje adipogénico**, se procedió de la siguiente manera: Se sembró una concentración de 18.000 células /cm² en medio de cultivo convencional. Transcurridas 48 horas, el medio de cultivo convencional se reemplazó por un medio de cultivo específico para la inducción a diferenciación adipogénica (Gibco Stem Pro, *adipocyte differentiation basal medium*). Se realizaron cambios de medio 3 veces por semana durante 2 semanas. A continuación realizamos tinciones durante 30 minutos con Oil Red para la tinción de lípidos propios de los adipocitos.

Para la diferenciación de las células obtenidas a **linaje osteogénico**, procedimos como se detalla a continuación: Se cultivó durante 48 horas una concentración de 18.000 células/cm² en medio de cultivo convencional, sustituyendo entonces por un medio de inducción osteogénica (Gibco Stem Pro, *osteocyte differentiation basal medium*). Se recambió el medio 3 veces por semana durante 1 mes. Finalmente, para la detección de la matriz cálcica, propia de linaje osteogénico, se utilizó una solución de Alizarin Red S al 2% ajustada a pH 4.2 durante 2 ó 3 minutos. A continuación se observaron las placas en el microscopio realizando fotografías para su posterior análisis cualitativo.

Por último, con el propósito de identificar las ASCs una vez implantadas, las células en pase 4-5 se transfectaron con lentivirus (CNIC, Madrid, España) para transducir la proteína verde fluorescente (GFP) según el protocolo del servicio de virología del CNIC. Las células GFP positivas fueron seleccionadas por sorting, a continuación se congelaron y almacenaron en nitrógeno líquido hasta su posterior utilización. Las células que finalmente se utilizaron en nuestro grupo de experimentos procedían de pase 8-9.

3. PREPARACIÓN DE IMPLANTES PARA LAS DISTINTAS APLICACIONES Y PROCEDIMIENTO DE APLICACIÓN:

3.1. PREPARACIÓN DE SUSPENSIÓN DE ASCs.

Una vez programados los ensayos, se descongelaron las células y se cultivaron durante una semana. A continuación se prepararon las jeringuillas con una concentración de 400.000 células ASCs por 100 µl de suero salino.

3.2. PREPARACIÓN DE INJERTOS DE ASCs SOBRE MEMBRANA AMNIÓTICA (MA-ASCs).

La MA procedente de la placenta humana se obtuvo del banco de tejidos de la Comunidad de Madrid. Habitualmente viene preparada sobre soportes de papel de celulosa, en fragmentos de 2x2, con los controles estrictos de esterilidad y negatividad serológica.

Sobre la capa estromal de la MA, se depositaron las ASCs a una concentración de 1×10^6 células en discos de MA de 17 mm de diámetro durante un período de 60 minutos, tiempo durante el cual habíamos comprobado previamente en un grupo de experimentos una buena adhesión de las ASCs a la superficie estromal de la MA. Por técnicas de inmunofluorescencia, se realizó la inmunodetección de estas células marcadas con GFP sobre la capa estromal de la MA.

3.3. PROCEDIMIENTO INYECCIÓN

Se realizó inyección subconjuntival en conjuntiva limbar con aguja de 25G de 100 µl por cuadrante, en los cuatro cuadrantes, alcanzando un total de 1.6×10^6 ASCs por ojo, en caso de los ojos tratados con ASCs, o de 100 µl de suero salino por cuadrante en los ojos adelfos (Figura 10).

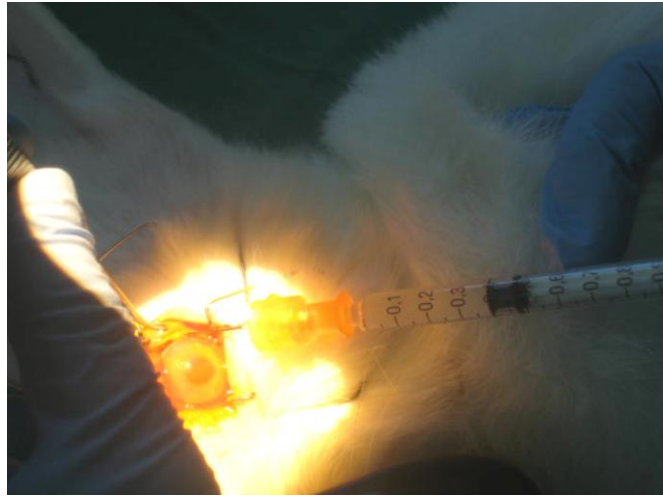


Figura 10. *Procedimiento de aplicación de Inyección de ASCs. Se aplican las ASCs mediante inyección en conjuntiva limbar en los 4 cuadrantes.*

3.4. COLOCACIÓN DEL INJERTO DE MA

Se realizó la aposición de la MA con la cara estromal en contacto con la córnea. De esta forma, las células ASCs quedaron dispuestas entre la córnea y la superficie interna de la MA. A continuación se suturó a la superficie ocular con 6-8 ptos de nylon 9/0 . Los puntos se retiraron a las 2 semanas (Figura 11). En la figura 12 se muestra un breve esquema de los puntos generales realizados en material y método.

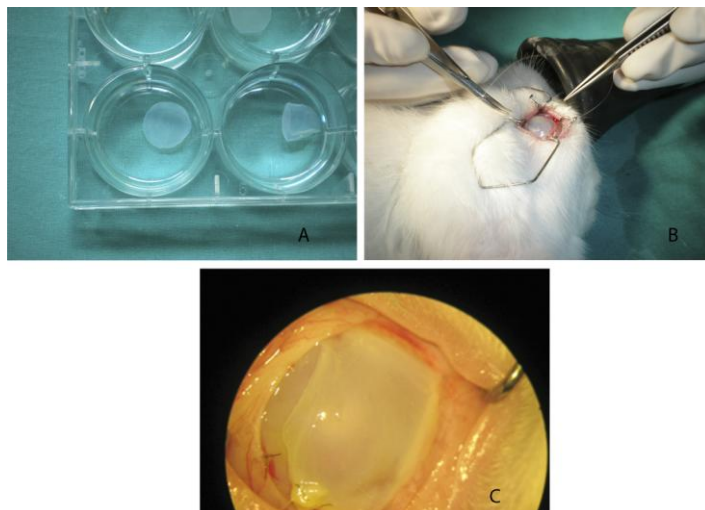


Figura 11. *Procedimiento de aplicación MA-ASCs. A: Se muestran los discos de MA con ASCs para implantar. B: Liberación de epitelio conjuntival y posicionamiento mediante sutura de nylon. C: Se aprecia la MA suturada sobre la superficie ocular.*

4. EVALUACIÓN CLÍNICA

Se realizó examen clínico ocular semanal durante 4 semanas previo al sacrificio. Para la evaluación clínica, los conejos fueron anestesiados con ketamina y xilacina según protocolo comentado anteriormente.

Los hallazgos clínicos fueron documentados por microscopio quirúrgico realizándose fotografía digital. Los defectos epiteliales corneales se observaron mediante tinción con fluoresceína. El área de neovascularización corneal y el defecto epitelial fueron calculados mediante programa informático Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij>). Cualquier incidencia en la evolución clínica que se observaba era recogida en el cuaderno de laboratorio (Tabla 3).

5. SACRIFICIO Y ESTUDIO HISTOLÓGICO E INMUNOHISTOQUÍMICO

A las 4 semanas de la aplicación se sacrificaron los animales mediante inyección intravenosa de cloruro de potasio 5M, y se enuclearon los ojos para estudio histológico e inmunohistoquímico (Tabla 3).

5.1. HISTOLOGÍA

5.1.1. FIJACIÓN E INCLUSIÓN EN PARAFINA

Tras la extracción del globo ocular, los ojos fueron fijados por inmersión en paraformaldehído al 4% durante al menos 3 días y un máximo de 7 días, antes de su inclusión en parafina. Previo a la inclusión en parafina se procedió al procesado automático de inclusión tisular con el procesador automático tisular 1200 de Leica. Tras el procesado de los tejidos, se pasaron las muestras al inclusor de parafina para la confección de los bloques.

Una vez obtenidos los bloques de parafina, se cortaron con el microtomo en secciones de 5 a 7 μm de espesor. Los cortes se sumergieron en un baño con agua destilada a 45°C, y se recogieron en un portaobjetos silanizado, almacenándose a temperatura ambiente para su utilización.

5.1.2. TINCIÓN HEMATOXILINA-EOSINA

Para la coloración de los cortes con hematoxilina-eosina, se procedió a la desparafinación de los cortes, sumergiéndolos en una cubeta con xilol durante 10 minutos dos veces. A continuación se rehidrataron sumergiéndolos durante 5 minutos en cubetas con alcoholes de concentración decreciente, comenzando con alcohol al 100%, siguiendo con alcohol al 96%, alcohol al 80%, alcohol al 70% pasando por último a una cubeta con agua destilada.

Una vez rehidratados los cortes, se sumergieron en una cubeta con hematoxilina-eosina durante 7 minutos. A continuación se pasaron a otra cubeta con agua 5 minutos para posteriormente realizar deshidrataciones a concentraciones de alcohol crecientes de 50%, 70%, 95% y 100% para finalizar con baños de xilol. Por último, se montaron los portaobjetos cubriéndolos con un cubreobjetos de cristal con medio de montaje DPX.

5.1.3. TINCIÓN PAS

Para la tinción con PAS se procedió a desparafinar las muestras durante una hora en estufa a 60°C y a continuación SE sumergieron en xilol durante 15 minutos y después, sometiendo a concentraciones decrecientes con alcohol absoluto durante 5 minutos, alcohol a 96° 5 minutos, alcohol a 80° otros 5 minutos, alcohol a 70° otros 5 minutos, y para finalizar, con agua destilada durante 5 minutos.

Una vez hidratados los cortes, se sumergieron en una cubeta con ácido Peryódico durante 20 minutos. Se lavaron con agua destilada y se embebieron en otra cubeta con el reactivo de Schiff durante 10 minutos. Tras nuevo lavado esta vez con agua corriente, se añadió hematoxilina de Mayer para contrastar durante 5 minutos, pasándolos después a alcohol al 96% 5 minutos, alcohol al 100% 5 minutos y xilol durante 10 minutos. Por último, se montaron los portaobjetos cubriéndolos con un cubreobjetos de cristal con medio de montaje DPX.

5.1.4. TÉCNICA INMUNOHISTOQUÍMICA

Los anticuerpos primarios utilizados fueron los siguientes: anticuerpo monoclonal de ratón anti-GFP (SC-9996; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), diluido 1:50, anticuerpo monoclonal de ratón anti-citoqueratinas K3/K76 clon AE5 (Millipore) dilución 1:50, anticuerpo monoclonal de ratón anti α -actina músculo liso (Dako) dilución 1:50, anticuerpo policlonal de conejo antipan-citoqueratina (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), dilución 1:50.

Para la realización de las técnicas inmunohistoquímicas, se colocaron los cortes histológicos en una estufa a 60°C durante 30 minutos. Después se procedió a desparafinar, como se comentó anteriormente, sumergiendo los portaobjetos en una cubeta con xilol durante 10 minutos, dos veces. A continuación se rehidrataron sumergiéndolos en cubetas con alcoholes de concentración decreciente, comenzando con alcohol al 100%, 5 minutos, siguiendo con alcohol al 96% 5 minutos, alcohol al 80% 5 minutos, y alcohol al 70% 5 minutos, pasando por último a una cubeta con agua destilada.

El desenmascaramiento antigénico se realizó por calor, introduciendo los cortes histológicos en una olla a presión, en una solución de citrato sódico a pH=6, dejándolos durante 3 minutos a máxima presión, esperando después unos 45 minutos a que los cortes se atemperaran para poder continuar con el protocolo. A continuación se hicieron dos lavados antes de poner los cortes en una cubeta con una solución de metanol con agua oxigenada al 0,5% durante 10 minutos para inhibir las peroxidasas endógenas que pudieran dar lugar a falsos positivos. Terminado este paso, se realizaron dos lavados en TBS a PH=7,6 y se procedió a incubar durante 1 hora con una solución de bloqueo al 5% de suero normal de cabra (SNC) y 0,001% de tritón X-100 en TBS, para inhibir las uniones inespecíficas.

Terminada la incubación con la solución de bloqueo, se procedió a añadir los anticuerpos primarios: anticuerpo monoclonal anti-GFP, dilución 1:50, anti-CK3, dilución 1:50 y anticuerpo monoclonal anti- α -actina, dilución 1:50 y se incubaron durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Al día siguiente, se lavaron los cortes histológicos dos veces con PBS, antes de añadir los anticuerpos secundarios correspondientes diluidos 1:500 (anti-ratón, Alexa Fluor 555; anti-conejo Alexa Fluor 555; anti-ratón Alexa Fluor 488 (Invitrogen)). A continuación, para quitar el exceso de anticuerpo secundario se procedió a lavado con PBS 2-3 veces durante 5 minutos.

Las secciones fueron montadas con el reactivo 40,6-diamino-2-fenilindol (DAPI) (Prolong Gold, Molecular Probes, Eugene) para identificar los núcleos y se observaron bajo el microscopio de fluorescencia (Leica DMI6000B).

Los controles negativos se hicieron en cortes histológicos que fueron incubados sin el anticuerpo primario, realizando el resto del protocolo igual.

5.1.5. EVALUACIÓN HISTOLÓGICA E INMUNOHISTOQUÍMICA

Una vez montados los cortes histológicos, se analizaron bajo microscopio Leica DM LS2 con ampliaciones a 20x y 40x por un patólogo en modo ciego para el tipo de tratamiento empleado.

Se analizaron cortes sagitales y se evaluaron dos regiones: córnea y limbo. Se analizaron los siguientes parámetros (Tabla 3): Estado del epitelio, distribución en la córnea de las células de goblet a magnificación 40x según la siguiente escala: 0: no células de goblet; 1: 1-2 céls/campo; 2: 3-4 células /campo; 3: 5-7 células por campo; 4: más e 7 células por campo. Para definir el grado de inflamación de forma semicuantitativa se valoró: la presencia de infiltrado inflamatorio agudo que comprendía PMN, eosinófilos y basófilos, así como de infiltrado inflamatorio crónico, con linfocitos y células plasmáticas. Se cuantificó según grados: 0, ausencia, 1, baja densidad; 2, densidad media; 3 alta densidad, 4: muy alta densidad. El modelo de inflamación de cada espécimen se estableció de acuerdo al tipo celular: inflamación aguda, crónica o mixta. En caso de desviaciones de la normalidad, se realizó un informe detallado.

En la evaluación inmunohistoquímica se estableció la inmunotinción de CK3, α -actina y GFP en rojo. La existencia de CK3 y GFP se evaluó en córnea, y limbo, gradándose 0= no tinción, 1= tinción leve, 2= tinción moderada y 3= tinción fuerte. La tinción de trazas de α -actina, indicación de la existencia de queratocitos activados respondió a la clasificación de: 0: ausencia, 1: baja densidad, 2: densidad media, 3: alta densidad y 4: muy alta densidad.

HALLAZGOS	CÓRNEA	LIMBO
1.-Desepitelización		
2.-Características del epitelio		
3.-Células de goblet		
4.-Células Inflamatorias		
5.-Neovasos		
6.-Otros hallazgos		
7.-CK 3		
8.- GFP		
9.- α - actina		

Tabla 3. *Parámetros evaluados en el estudio histológico e inmunohistoquímico al sacrificio.*

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico se ha empleado el programa estadístico SPSS versión 12.0 para Windows (SPSS Inc, Chicago, Illinois). Los datos cuantitativos fueron descritos como medias y desviaciones estándar y los datos cualitativos como frecuencias absolutas y porcentajes. La asociación entre las variables dicotómicas se estableció mediante el test exacto de Fisher. La variación temporal de las variables estudiadas se estimó utilizando el método de mínimos cuadrados. Se consideró como valor de corte para la significación estadística una $p < 0,05$.

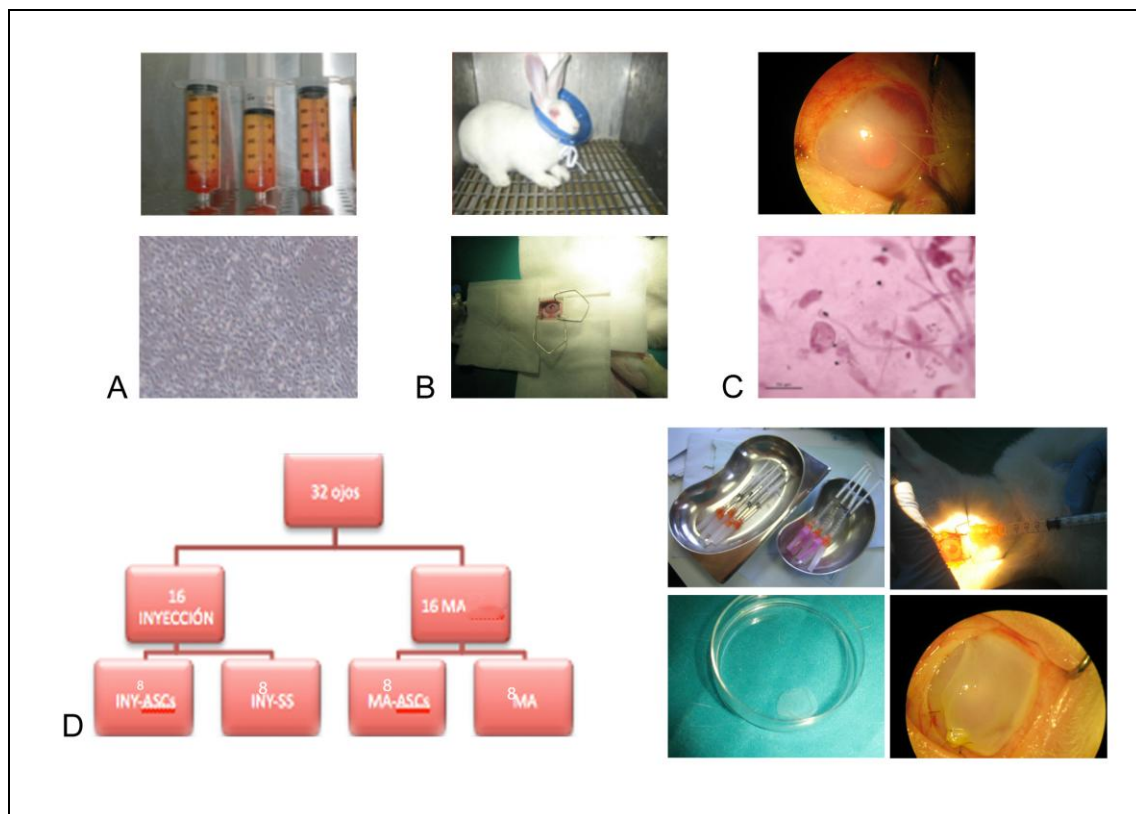


Figura 12. Esquema general de los principales puntos realizados en Material y Método. A: Aislamiento y preparación de ASCs. B: Creación de un modelo de causticación mediante aplicación de NAOH 1% durante 10 segundos en ojos de conejos albinos raza New Zealand. C: Generación del cuadro de Insuficiencia Límpica: aspecto clínico y confirmación por citología de impresión a la semana del daño. D: Modelo de administración: aplicación de ASCs mediante procedimiento inyección frente al modelo de aplicación sobre MA.

RESULTADOS

1. CONFIRMACIÓN DEL MODELO DE INSUFICIENCIA LÍMBICA MEDIANTE CITOLOGÍA DE IMPRESIÓN

A la semana del daño el 100% de los ojos presentaban a la exploración hallazgos clínicos de NVC, defectos epiteliales y reflejo mateado sobre parte de la superficie corneal epitelizada. No hubo diferencias en la apariencia clínica respecto a transparencia corneal, conjuntivalización y vascularización entre los grupos.

La citología de impresión realizada en ese momento mostró la existencia de células caliciformes sobre la superficie corneal en 7 de los 32 ojos (21,87%). El grado de metaplasia escamosa corneal, índice de desarrollo de insuficiencia límbica, según la escala utilizada por Rivas et al (Tabla 2), fue mayor o igual de 3 en todos los ojos (Figura 13).

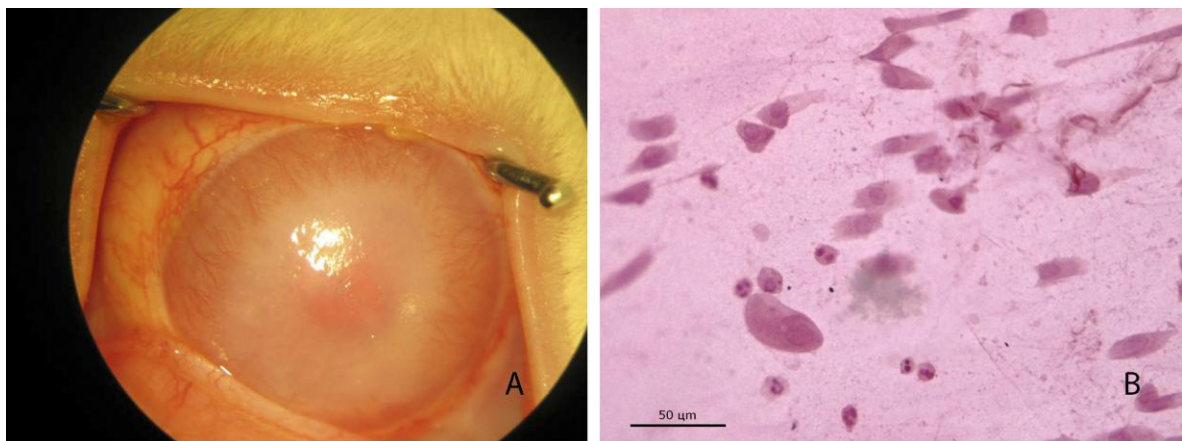


Figura 13. *Insuficiencia Límbica. Aspecto clínico y citología de impresión de la córnea a la semana de la causticación. A: Se muestra la NVC, opacidad e irregularidad corneal propios de la Insuficiencia límbica. B: Citología de Impresión: Observamos la existencia de células caliciformes y metaplasia escamosa con núcleos picnóticos (40x) .*

2. CARACTERIZACIÓN IN VITRO DE ASCs

El cultivo primario de células obtenidas de la extracción de grasa y procesamiento, alcanzaba a la semana una confluencia del 80-90% (Figura 14).

Mediante citometría de flujo se comprobó que las células de la grasa de conejo de raza New Zealand que estábamos cultivando presentaban alta expresión de CD90 y CD44 (100%) y ausencia de HLA-DR, CD34 y CD45, demostrando la naturaleza mesenquimal de las células utilizadas(figura 15).

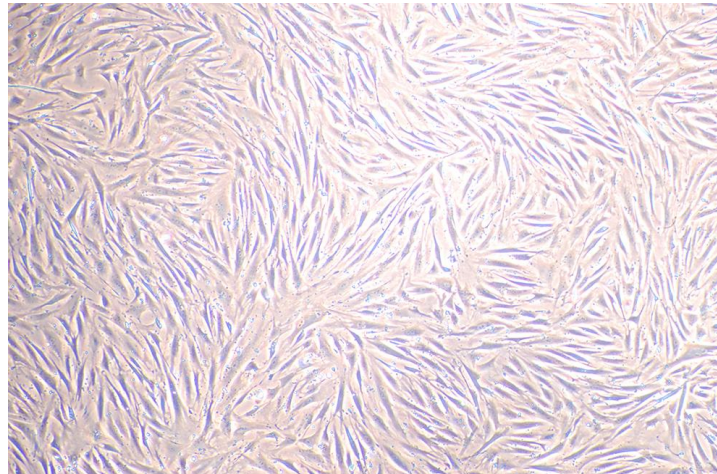


Figura 14. Cultivos celulares de ASCs. Microscopía de contraste de fases. Se aprecian las células con una morfología fusiforme y entrelazadas al llegar a confluir en el cultivo primario.

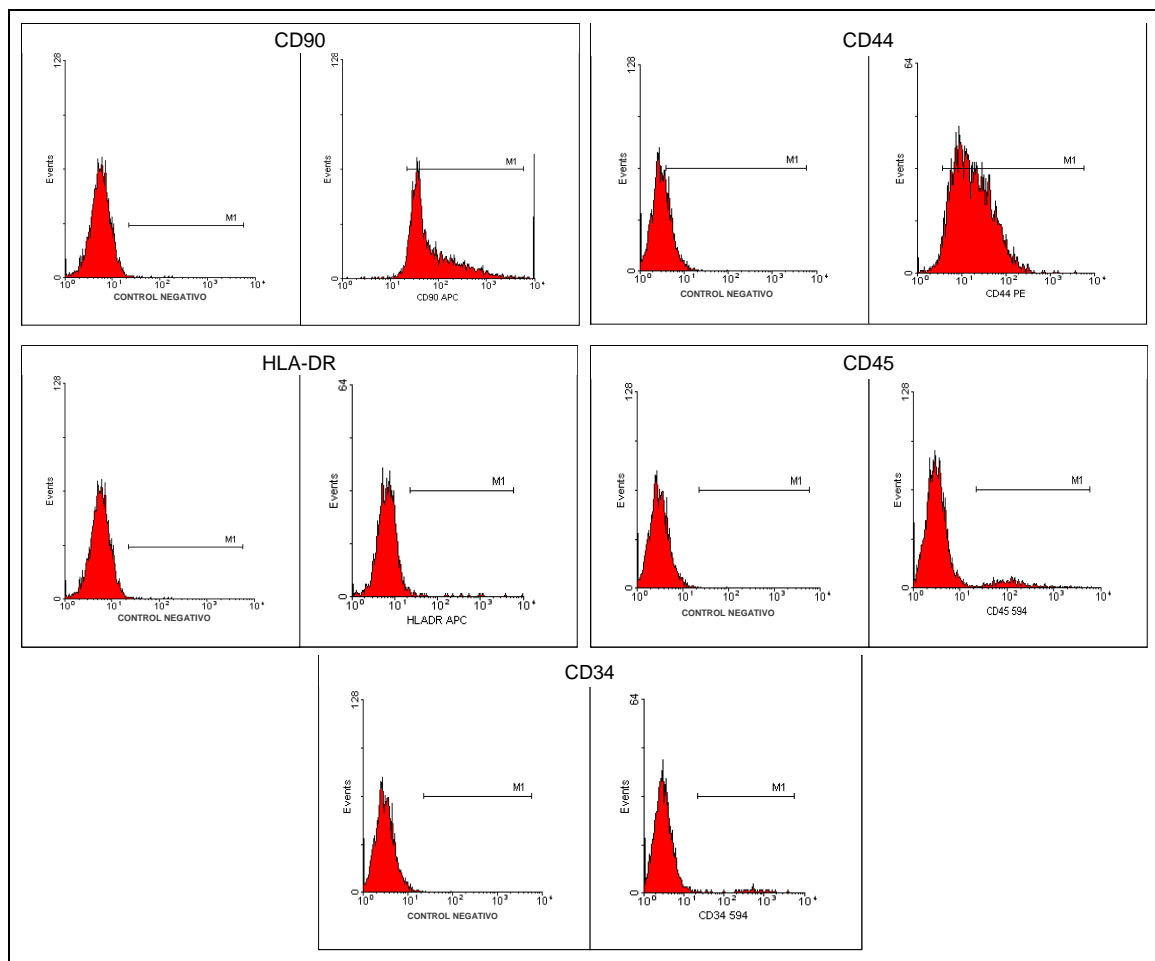


Figura 15. Histogramas que muestran tras análisis en el citómetro de flujo, la alta expresión de los marcadores de superficie CD90 y de CD44 y la negatividad para HLA-DR, CD45 y CD 34 en las ASCs testadas.

Para demostrar que las ASCs aisladas tenían la capacidad de diferenciarse a otras líneas celulares, se indujeron para que se diferenciases hacia un linaje adipogénico y osteogénico, consiguiendo el resultado esperado, demostrándose por tanto la capacidad de diferenciación (Figura 16) y confirmando la naturaleza mesenquimal de las células utilizadas.

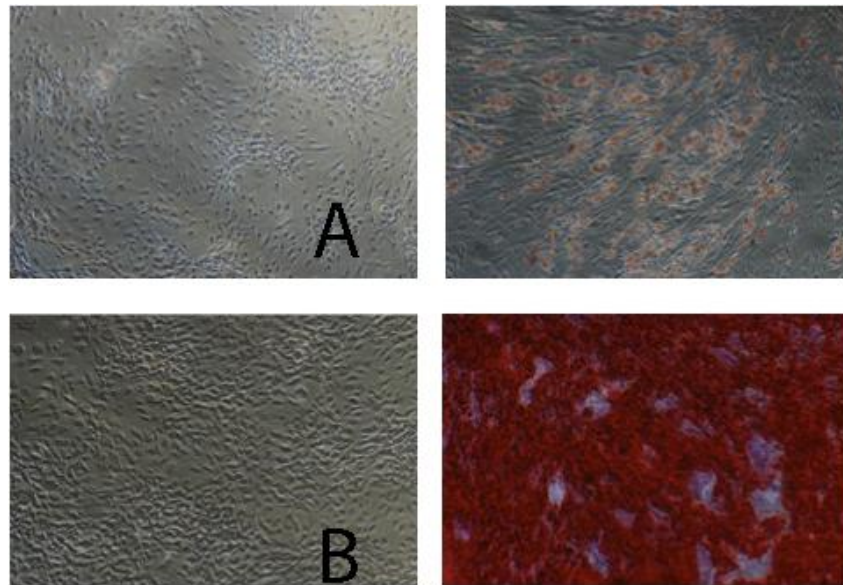


Figura 16. *Diferenciación de ASCs a linaje adipogénico y osteogénico con sus respectivos controles. A: A la derecha se observa la tinción de la grasa con Red Oil, propia del tejido adiposo; a la izquierda su control. B: A la derecha observamos la matriz ósea que representa al tejido osteogénico, teñida con Alizarín Red; se muestra el control a la izquierda.*

3. INMUNOLOCALIZACIÓN DE ASCs

3.1. EN EL IMPLANTE DE MA-ASCs

Mediante técnicas de inmunofluorescencia aplicadas sobre los implantes de MA-ASCs que posteriormente colocaríamos sobre la SO, confirmamos la existencia de ASCs marcadas con GFP (Figura 17).

La inmunofluorescencia permitió evaluar la estructura de los injertos MA-ASCs. A nivel de la MA, observamos la existencia de células epiteliales con positividad en la tinción para pancitoqueratina. Las células ASCs marcadas con GFP quedaban dispuestas sobre la superficie estromal de la MA, adheridas a la misma.

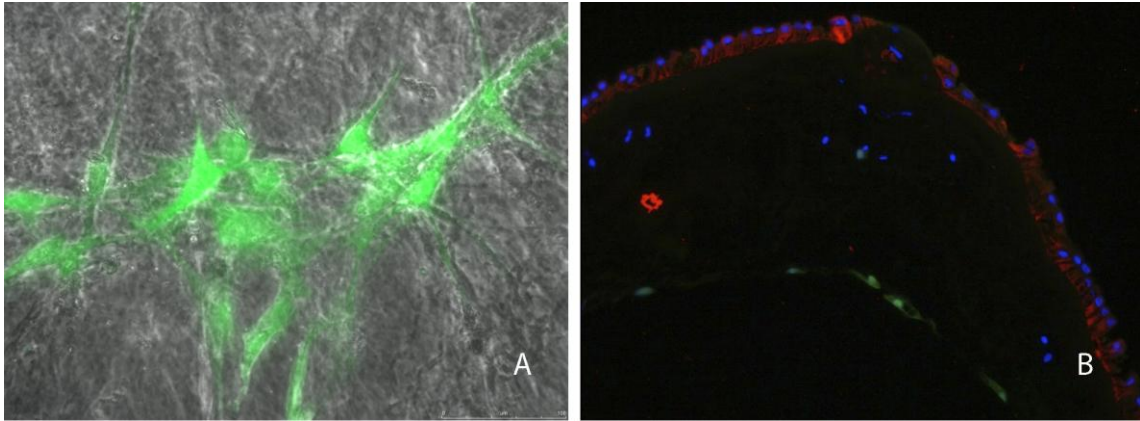


Figura 17. Injertos de MA-ASCs. A: Fotografía combinada de fluorescencia con contraste de fases que muestra las células ASCs marcadas con GFP sobre el sustrato de MA. B: Se muestra por inmunotinción la estructura de la membrana amniótica con las células epiteliales cuyos núcleos están teñidos con DAPI (azul), y son positivas para citoqueratinas (rojo). Las ASCs marcadas con GFP se muestran de color verde y están dispuestas sobre la cara estromal de la MA.

3.2. INMUNOLocalIZACIÓN DE ASCs EN EL TEJIDO OCULAR

Por técnicas de inmunofluorescencia demostramos la existencia en el tejido ocular de las ASCs implantadas a las 24 horas de su aplicación, en el modelo inyección. No observamos las células en el momento del sacrificio (4 semanas). En el modelo MA-ASCs se inmunolocalizaron ASCs en un número escaso a las 2 y 4 semanas de la aplicación. (Figura 18)

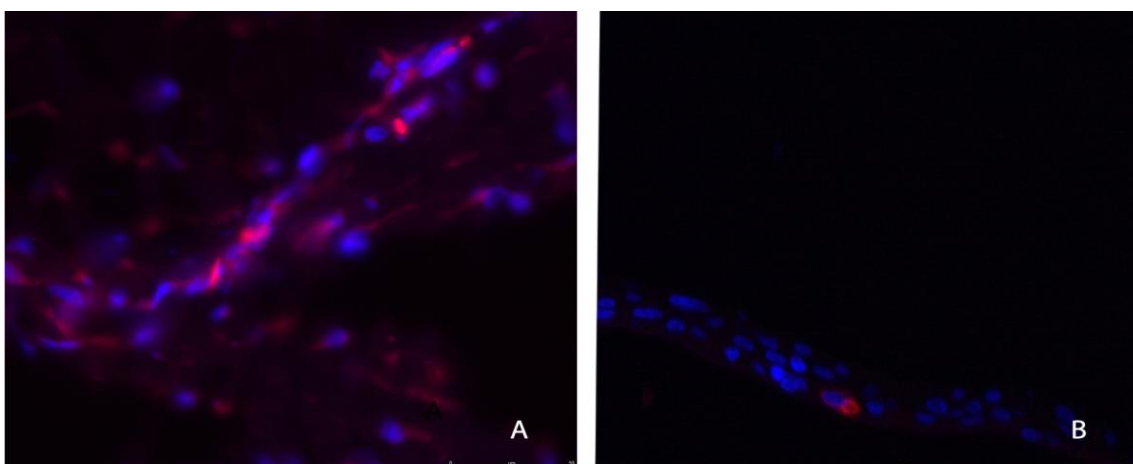


Figura 18. Inmunolocalización de ASCs en el tejido ocular. A: Se demuestra la existencia de células ASCs marcadas con GFP (rojo) a nivel subconjuntival en el procedimiento inyección a las 24 horas de su aplicación. B: Existencia de una célula ASCs marcadas con GFP (rojo) a las 4 semanas en el procedimiento Membrana Amniótica.

4. RESULTADOS BIOMICROSCÓPICOS

4.1. ANÁLISIS DE LOS OJOS TRATADOS CON ASCs VS NO TRATADOS CON ASCs

Para valorar la influencia de la implantación de ASCs sobre la SO en nuestro modelo de causticación, se evaluaron un total de 32 ojos con quemadura corneal correspondientes a 16 conejos. En 16 ojos, correspondientes a ojos izquierdos, se aplicaron ASCs a la semana del daño, y en los 16 ojos adelfos sin la aplicación de ASCs, correspondiendo a ojos derechos.

4.1.1. PERFORACIÓN CORNEAL

Se observó un mayor porcentaje de perforaciones corneales en los ojos que no habían sido tratados con ASCs respecto a los ojos donde sí se habían aplicado ASCs, con una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05\%$).

De todos los ojos donde se habían administrado ASCs, sólo uno (6,3%) presentó perforación, mientras que ésta aconteció en 6 de los 16 ojos donde no se habían administrado (37,5%)(Tabla 4). La única perforación corneal en ojos con administración de ASCs ocurrió a las 4 semanas, mientras que el resto de perforaciones en ojos control se produjeron a las dos semanas en cuatro ojos y a las cuatro semanas en dos ojos.

	SI PERFORACIÓN	NO PERFORACIÓN	TOTAL
NO ASCs	6(37,5%)	10(62,5%)	16(100%)
ASCs	1(6,25%)	15(93,75%)	16(100%)
TOTAL	7(21,87%)	25(78,25%)	32(100%)
Test Fisher	0,018*		

Tabla 4. Distribución del evento perforación corneal en función de la aplicación de ASCs.

4.1.2. ADELGAZAMIENTO CORNEAL

La aparición de adelgazamientos corneales de cualquier grado fue muy similar tanto en ojos de los grupos ASCs (31,3%), como en ojos donde no se administraron ASCs (37,5%) (Tabla 5; Figura 19).

	SI ADELGAZAMIENTO	NO ADELGAZAMIENTO	TOTAL
NO ASCs	6(37,5%)	10(62,5%)	16(100%)
ASCs	5(31,3%)	11(68,7%)	16(100%)
TOTAL	11(34,4%)	21(65,6%)	32(100%)
Test exacto de Fisher	1		

Tabla 5. Distribución del evento adelgazamiento corneal en función de la aplicación de ASCs.

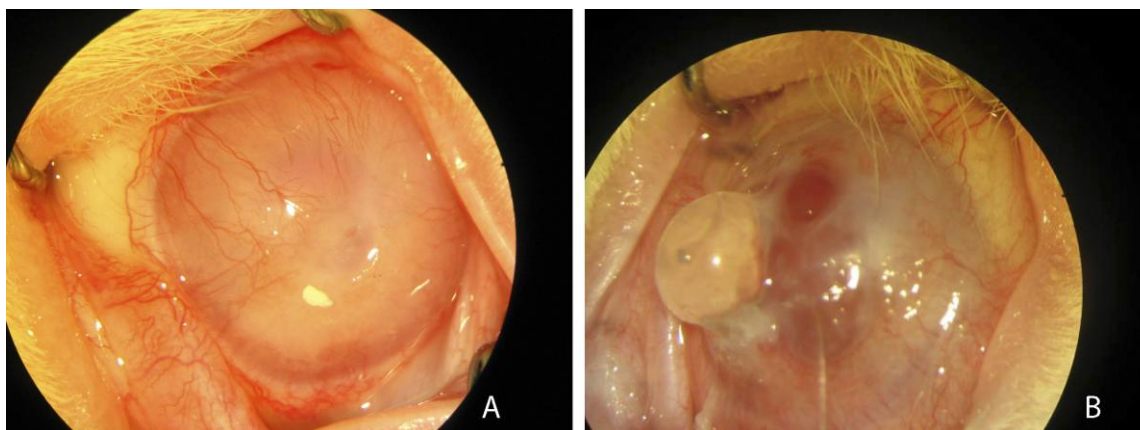


Figura 19. Fotografía que muestra adelgazamientos corneales con diferentes grados de severidad. A: La imagen muestra adelgazamiento estromal anterior correspondiente a un ojo tratado con ASCs. B: Se muestra un ojo no tratado con ASCs, a las tres semanas de causticación, que presenta un descematocele y perforación inminente.

4.1.3. CALCIFICACIÓN CORNEAL

La aparición de calcificaciones corneales fue clínicamente superior en los ojos donde no se habían aplicado ASCs (25% vs 6,3%) (Tabla 6; Figura 20).

La única calcificación observada en el ojo tratado mediante ASCs, ya estaba presente a la semana del daño, antes de proceder a la aplicación del tratamiento. Salvo este ojo, todas las calcificaciones acontecieron a las dos semanas.

GRUPO	SI CALCIFICACIÓN	NO CALCIFICACIÓN	TOTAL
NO ASCs	4(25%)	12(75%)	16(100%)
ASCs	1(6,3%)	15(93,8%)	16(100%)
TOTAL	5(15,6%)	27(84,4%)	32(100%)
Test exacto de Fisher	0,33		

Tabla 6. Distribución del evento calcificación corneal en función de la aplicación de ASCs.

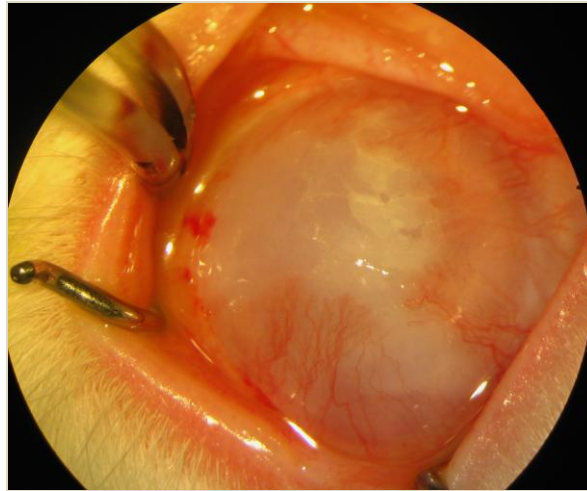


Figura 20. Fotografía de la SO correspondiente a un ojo no tratado con ASCs donde se muestran las calcificaciones corneales a nivel central.

4.1.4. NEOVACULARIZACIÓN CORNEAL

El porcentaje medio de área de NVC en ojos no ASCs frente a ojos con administración de ASCs en sus diversas modalidades, a tiempo basal, a la semana del daño y a 1, 2, 3 y 4 semanas postratamiento viene expresado en la siguiente tabla:

GRUPO	BASAL	1SEM	2SEM	3SEM	4SEM
NO ASCs	20,85± 9,66	28,93±16,71	38,96±16,76	40,92±21,06	50,81±21,99
ASCs	19,52±8,88	33,27±16,52	37,46±18,72	43,75±17,49	51,65±19,40

Tabla 7. Media y desviación estándar del porcentaje de área de NVC según grupo de aplicación y su evolución en el tiempo.

Se observó que nuestro modelo animal de daño fue eficaz en reproducir los signos de insuficiencia límbica como la NVC en ambos grupos desde tiempos basales.

La estimación de las medias del porcentaje de NVC demostró una misma tendencia angiogénica en los dos grupos, y también que el tratamiento mediante la aplicación de ASCs no modificaba el curso de la angiogénesis corneal (Figura 21).

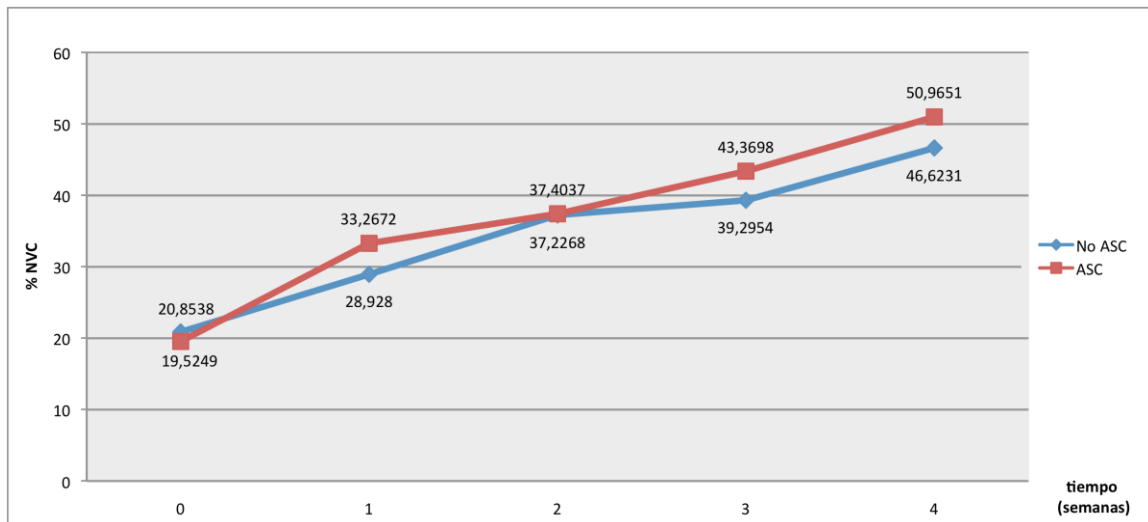


Figura 21. Medias estimadas del porcentaje de área de NVC y su evolución en ojos con y sin aplicación de ASCs.

4.1.5. DEFECTO EPITELIAL

El porcentaje medio de DE en ojos sin aplicación de ASCs vs con aplicación de las mismas, en sus diversas modalidades, en los tiempos basal, 1, 2, 3 y 4 semanas postratamiento se expresa en la siguiente tabla:

	BASAL	1SEM	2SEM	3SEM	4SEM
NO ASCs	36,80±13,78	36,29±11,68	40,25±16,74	37,12±17,21	35,67±16,16
ASCs	34,15±12,22	39,91±16,31	39,63±20,11	32,85±14,38	32,55±16,05

Tabla 8. Media y desviación estándar del porcentaje de área de DE en ojos con y sin aplicación y su evolución en el tiempo.

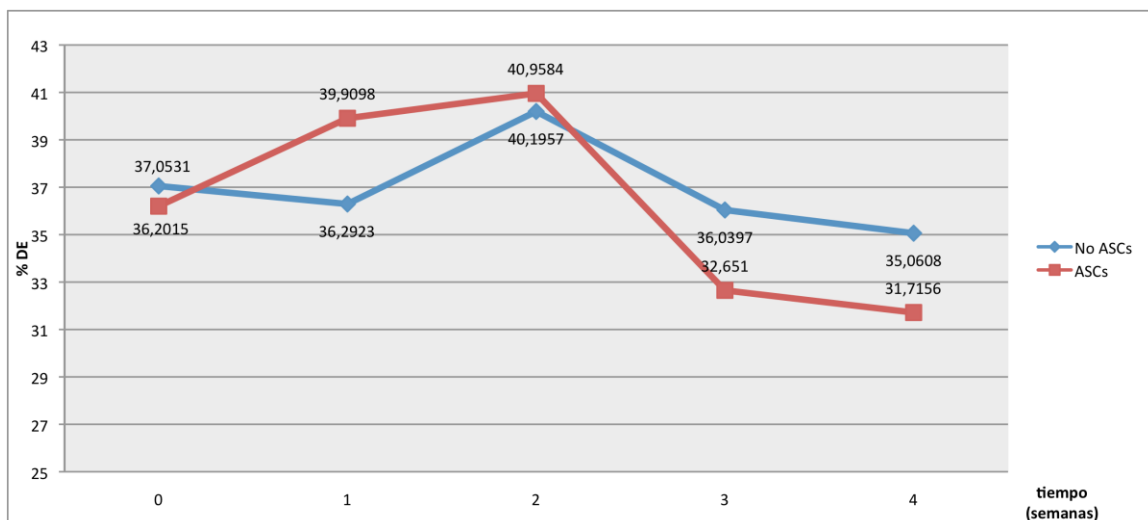


Figura 22. Medias estimadas del porcentaje de área de DE y su evolución en ojos con y sin la aplicación de ASCs.

Observamos que el tamaño del defecto epitelial basal tras la causticación no se mantenía estable, sino que aumentaba hasta las dos semanas en ambos grupos para después proceder al inicio del cierre del defecto. Aunque no se identificaron diferencias significativas en cuanto al DE final entre ambos grupos ni en otros tiempos del seguimiento, la estimación de las medias para el DE expresó en el grupo tratado mediante ASCs una disminución del DE del 8,30% entre las 2 y 3 semanas que resultó estadísticamente significativa. ($p=0,0375\%$ *) (Figura 22).

Por tanto, las ASCs demostraron un efecto beneficioso clínico en la disminución de perforaciones y calcificaciones corneales así como en acelerar el cierre del defecto epitelial aunque no influyeron en el curso de la NVC ni en el tamaño del defecto epitelial final.

4.2. ANÁLISIS POR SUBGRUPOS SEGÚN MODELO DE ADMINISTRACIÓN

4.2.1. GRUPO INYECCIÓN

Se evaluaron un total de 16 ojos con insuficiencia límbica de 8 conejos, a 8 se les aplicó inyección de ASCs en conjuntiva limbar, correspondiendo a ojos izquierdos, (Iny-ASCs) y a 8 ojos inyección de suero salino a nivel de conjuntiva limbar, correspondiendo a ojos derechos (Iny- SS).

4.2.1.1. Perforación corneal

Las perforaciones corneales ocurrieron exclusivamente en ojos con inyección de Suero Salino (Tabla 9). Una de ellas aconteció a las dos semanas y la otra a las 4 semanas.

	SI PERFORACIÓN	NO PERFORACIÓN	TOTAL
INY-SS	2(25%)	6(75%)	8 (100%)
INY- ASCs	0(0%)	8(100%)	8 (100%)
TOTAL	2(12,5%)	14(87,5%)	16 (100%)
Test de Fisher	$p = 0,233$		

Tabla 9. *Distribución del evento perforación corneal en el modelo de aplicación inyección según el grupo de administración.*

4.2.1.2. Adelgazamiento corneal

El adelgazamiento corneal fue irreversible en todos los ojos donde aparecía. La distribución de adelgazamientos corneales de cualquier grado en algún momento del seguimiento viene expresada en la tabla 10.

	SI ADELGAZAMIENTO	NO ADELGAZAMIENTO	TOTAL
INY- SS	5(62,5%)	3(37,5%)	8 (100%)
INY- ASCs	2(25%)	6(75%)	8 (100%)
TOTAL	7(43,8%)	9(56,3%)	16 (100%)
Test de Fisher	p = 0,315		

Tabla 10. Distribución del evento adelgazamiento corneal en el modelo de aplicación inyección según el grupo de administración.

4.2.1.3. Calcificaciones corneales

Las concreciones cálcicas aparecieron a las dos semanas en 3 de 8 ojos sin aplicación de ASCs (37,5%) y en 1 de 8 ojos tratados con ASCs (12,5%) (Tabla 11). La calcificación observada en el grupo con ASCs ya estaba descrita a la semana del daño, antes de proceder a la inclusión en el grupo de tratamiento.

	SI CALCIFICACIÓN	NO CALCIFICACIÓN	TOTAL
INY-SS	3 (37,5%)	5(62,5%)	8 (100%)
INY-ASCs	1(12,5%)	7(87,5%)	8 (100%)
TOTAL	4(25%)	12 (75%)	16 (100%)
Test de Fisher	p = 0,569		

Tabla 11. Distribución del evento calcificación corneal en el modelo de aplicación inyección según el grupo de administración.

4.2.1.4. Neovascularización corneal

El porcentaje medio de área de NVC de nuestra serie, en los tiempos basal, 1, 2, 3 y 4 semanas tras la inyección se expresa en la tabla 12.

	Basal	1 sem	2 sem	3 sem	4 sem
INY-SS	25,42±8,11	33,82±13,80	37,82±16,69	38,03±19,71	46,85±13,98
INY-ASCs	23,47±11,47	36,13±16,45	41,07±19,28	48,80±21,76	54,65±28,08

Tabla 12. Media y desviación estándar del porcentaje de área de NVC en el modelo de aplicación inyección según grupo de administración y su evolución en el tiempo.

Las medias estimadas por el modelo mixto ajustado a los datos de porcentaje de NVC expresaron que tanto en el grupo control como en el grupo tratado existía un incremento de NVC en todos los tiempos con respecto a la exploración basal, ($p < 0,05$). Las mayores diferencias entre ambos grupos se encontraron a las tres y cuatro semanas, con un 9,34% más de área de NVC en ojos tratados con ASCs en la semana tres y un 7,26% de NVC en la semana 4. Estas diferencias no mostraron significación estadística ($p = 0,31$ y $p = 0,45$ respectivamente) (Figura 23).

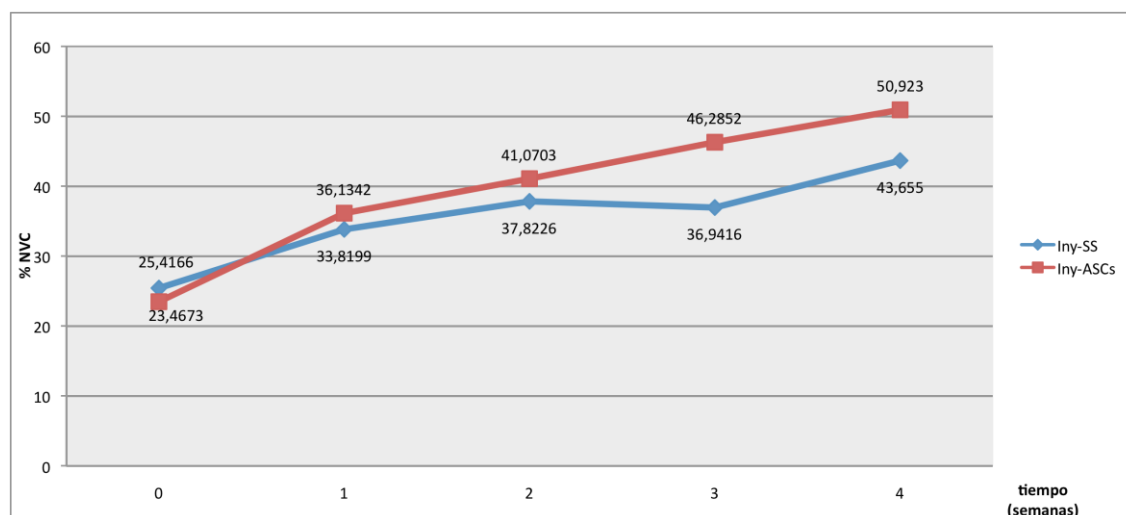


Figura 23. Medias estimadas del porcentaje de NVC y su evolución en el modelo de aplicación inyección según grupo de administración.

4.2.1.5. Defecto epitelial

La tabla 13 expresa el porcentaje medio de DE de nuestra serie, en los tiempos basal, 1,2,3 y 4 semanas tras la inyección.

	Basal	1 sem	2 sem	3 sem	4 sem
INY-SS	34,50±13,98	38,33±11,33	41,07±12,97	36,51±14,94	31,90±18,86
INY-ASCs	32,81±10,95	37,39±19,22	42,31±26,28	29,64±14,65	31,43±19,14

Tabla 13. Media y desviación estándar del porcentaje de área de DE en el modelo de aplicación inyección según grupo de administración y su evolución en el tiempo.

No se establecieron diferencias significativas en el tamaño de la desepitelización entre ambos grupos en ningún momento del seguimiento. En el grupo Inyección de ASCs, se observó un cierre del área de defecto epitelial de un 11,43% entre las 2 y las 3 semanas con tendencia a la significación estadística ($p = 0,0601$ *) (Figuras 24 y 25).

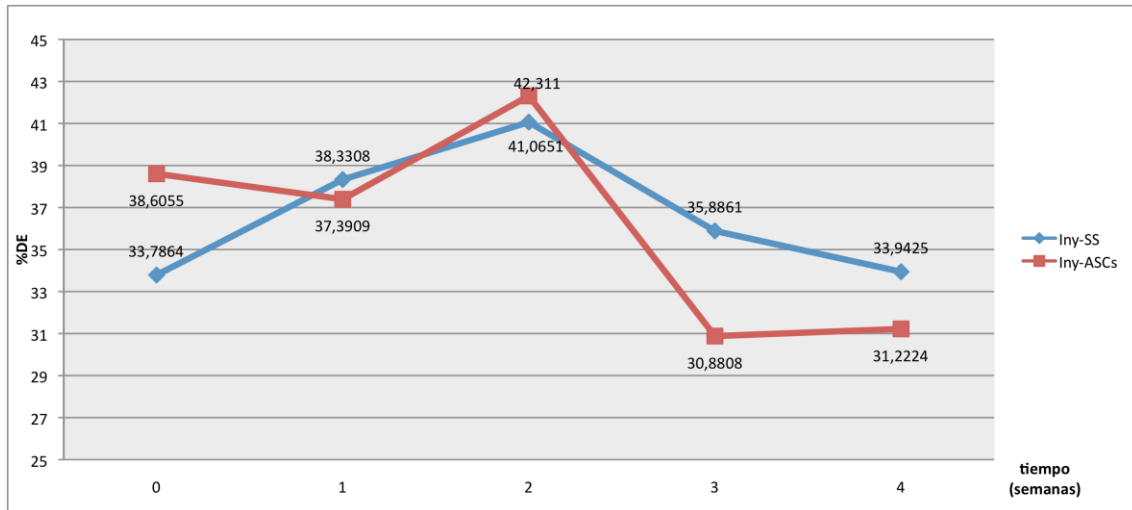


Figura 24. Medias estimadas del porcentaje de DE y su evolución en el modelo de aplicación inyección según el grupo de administración.

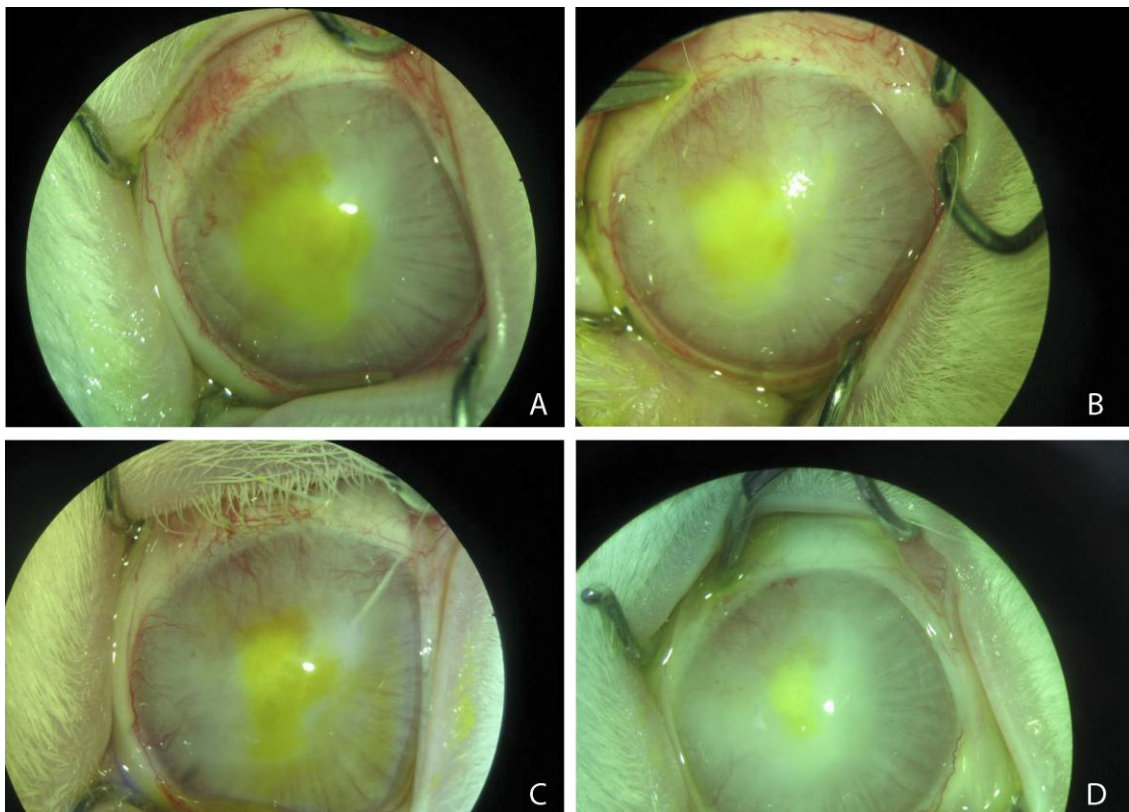


Figura 25. Se muestra mediante tinción con fluoresceína el cierre del defecto epitelial en un ojo tratado mediante inyección de ASCs. A: a la semana de su aplicación, B: a 2 semanas, C: 3 semanas y D: 4 semanas.

4.2.2. GRUPO MEMBRANA AMNIÓTICA

Se evaluaron un total de 16 ojos con insuficiencia límbica de 8 conejos. En 8 ojos izquierdos se procedió a la colocación de injertos que contenían ASCs, (grupo MA-ASCs) y en 8 ojos derechos se aplicó injerto de MA, (grupo MA).

4.2.2.1. Perforación corneal

Observamos perforaciones corneales en el 50% de los ojos tratados exclusivamente con MA, esto es, 4 de 8 ojos, 3 de ellas ocurrieron a las 2 semanas y una a las 4 semanas. En este último apareció un infiltrado supurativo denso sugestivo de absceso corneal que no se filió microbiológicamente.

Respecto al grupo de ojos tratados, la perforación que ocurrió en 1 de 8 ojos, (12,75%) y se manifestó a las 4 semanas, también sugería infección por el aspecto aunque no se realizó estudio microbiológico (Tabla 14; Figura 26).

	SI PERFORACIÓN	NO PERFORACION	TOTAL
MA	4 (50%)	4 (50%)	8 (100%)
MA-ASCs	1(12,5%)	7 (87,5%)	8 (100%)
TOTAL	5 (31,3%)	11 (68,8%)	16 (100%)
Test de Fisher	p = 0,282		

Tabla 14. Distribución del evento perforación corneal en el modelo de aplicación MA según grupo de administración.



Figura 26. Descematocele corneal en un ojo control a las 2 semanas de la aplicación de la MA. Se observa la persistencia de MA retraída hacia superior.

4.2.2.2. Adelgazamiento corneal

Clínicamente observamos mayor número de adelgazamientos corneales en el grupo tratado mediante MA-ASCs. (Tabla 15)

	SI ADELGAZAMIENTO	NO ADELGAZAMIENTO	TOTAL
MA	1 (12,5%)	7(87,5%)	8 (100%)
MA_ASCS	3(37,5%)	5(62,5%)	8 (100%)
TOTAL	4(25%)	12(75%)	16(100%)
Test de Fisher	p = 0,569		

Tabla 15. Distribución del evento adelgazamiento corneal en el modelo de aplicación MA según grupo de administración.

4.2.2.3. Calcificaciones

La única calcificación que aconteció en este grupo, se observó en el grupo MA a las 2 semanas.

	SI CALCIFICACIÓN	NO CALCIFICACIÓN	TOTAL
MA	1 (12,5%)	7(87,5%)	8 (100%)
MA-ASCs	0	8(100%)	8 (100%)
TOTAL	1(6,3%)	15 (93,8%)	16 (100%)
Test de Fisher	p = 1		

Tabla 16. Distribución del evento calcificación corneal en el modelo de aplicación MA según grupo de administración.

4.2.2.4. Neovascularización corneal

El porcentaje medio de área de NVC de nuestra serie, en los tiempos basal, 1, 2, 3 y 4 semanas postratamiento viene expresado en la siguiente tabla (Tabla 17).

NVC (%)	Basal	1 semana	2 sem	3 sem	4 sem
CONTROL (MA)	16,29±9,31	24,04±18,79	40,47±18,31	44,96±24,53	56,74±26,34
TTO (MA-ASCs)	16,08±3,96	30,76±17,28	33,24±18,86	37,70±9,41	48,66±5,96

Tabla 17. Media y desviación estándar del porcentaje de NVC en el modelo de aplicación MA según grupo de administración y su evolución en el tiempo.

Las ASCs no confirieron mayor efecto angiogénico sobre la superficie ocular si las células se implantaban junto a MA. El análisis individual de cada grupo para el porcentaje medio de NVC demostró incrementos significativos de NVC respecto a la basal en el grupo MA-ASCs desde la semana primera del tratamiento mientras que en el grupo MA ocurría a partir de la segunda semana ($p<0,05$)(Figura 27).

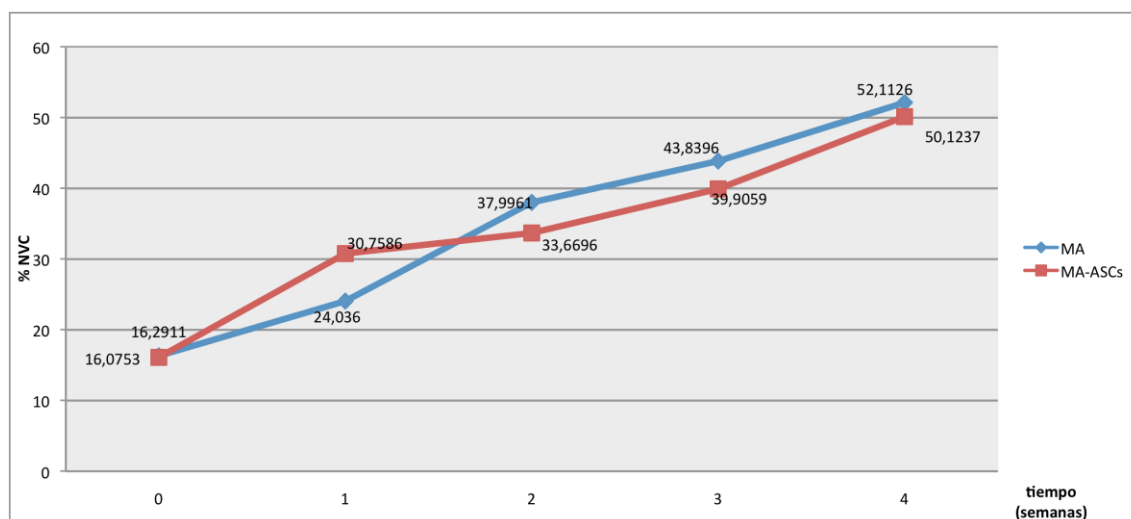


Figura 27. Medias estimadas del porcentaje de NVC y su evolución en el modelo de aplicación MA según grupo de administración.

4.2.2.5. Defecto epitelial

A continuación expresamos las medias de DE corneal en el grupo de tratados en la exploración basal y a 1, 2, 3 y 4 semanas del tratamiento (Tabla 18).

	Basal	1 sem	2 sem	3 sem	4 sem
MA	38,77±14,39	34,51±12,45	39,10±22,70	37,85±21,45	40,38±13
MA-ASCs	34,98±13,61	42,11±14,28	35,87± 7,79	36,70±14,67	33,68±14,49

Tabla 18. Media y desviación estándar del porcentaje de DE en el modelo de aplicación MA según grupo de administración y su evolución en el tiempo.

No existió diferencia en cuanto a DE final entre ambos grupos. Se observó que una reabsorción de la MA más precoz (1 semana) en los ojos a los que se implantaban MA con ASCs y más tardía si la MA carecía de células. En el análisis de medias estimadas observamos en el grupo tratado con MA-ASCs un incremento de 9,14% en el DE en el grupo MA-ASCs a la semana del tratamiento ($p>0,05$) mientras que en este mismo tiempo la tendencia fue a la epitelización en el grupo control (MA) para un posterior aumento del defecto.

Observamos una tendencia a la reepitelización a a partir de la primera semana de tratamiento en el grupo MA-ASCs y dos semanas en el grupo MA. (Figuras 28 y 29).

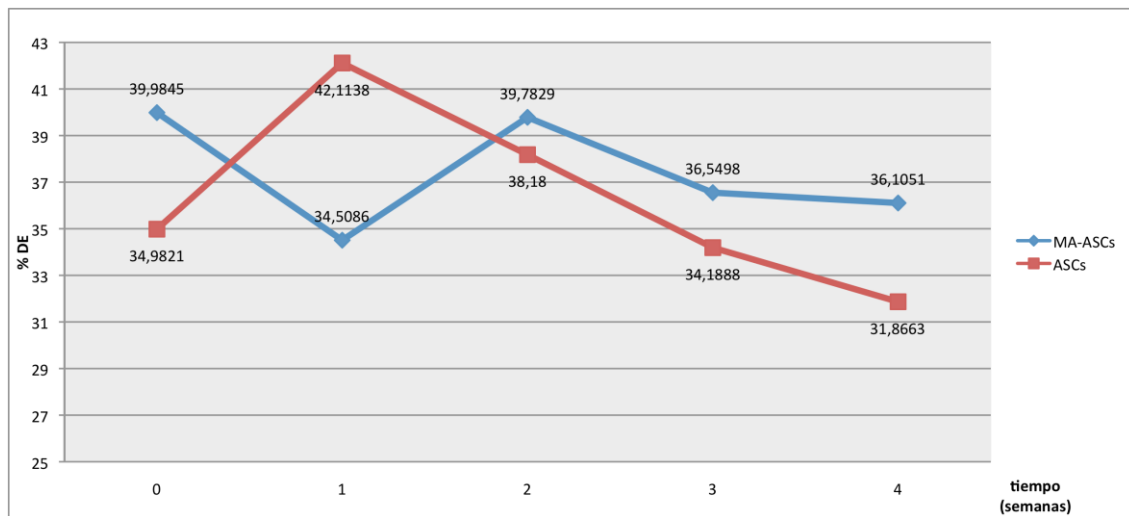


Figura 28. Medias estimadas del porcentaje de DE y su evolución en el modelo de aplicación MA según grupo de administración.

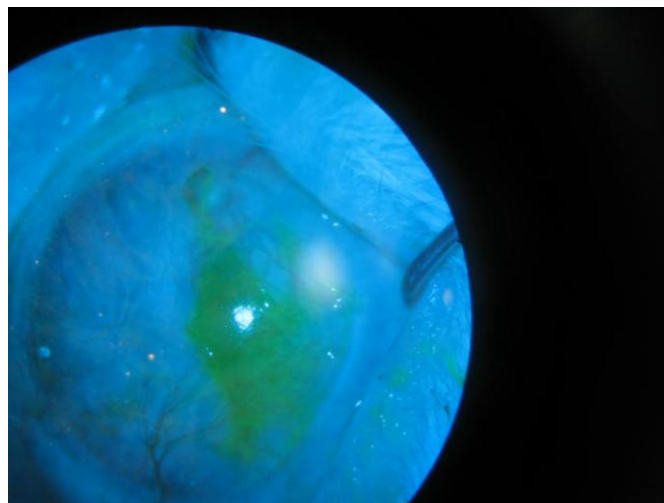


Figura 29. Fotografía de la superficie ocular que muestra el defecto epitelial central mediante tinción con fluoresceína y luz azul cobalto en un ojo tratado con MA-ASCs a las 4 semanas de implantación.

4.3. COMPARACIÓN ENTRE AMBOS GRUPOS DE TRATAMIENTO (INYECCIÓN ASCs vs MA-ASCs)

Con el objetivo de analizar si la MA aplicada junto a ASCs podría modificar el curso de la NVC ó el DE, se estableció una comparativa entre los 16 ojos de 8 conejos,

8 ojos tratados mediante inyección de ASCs y los 8 ojos tratados mediante ASCs bajo parche de MA.

4.3.1. PERFORACIÓN CORNEAL

Únicamente se constató perforación corneal en un ojo tratado con ASCs, que correspondió al modelo de aplicación MA-ASCs. Aunque no se tomaron cultivos, como se comentó anteriormente, la perforación ocurrió a las cuatro semanas y el aspecto orientaba a un origen infeccioso.

4.3.2. CALCIFICACIONES CORNEALES

Aunque hubo un ojo con calcificación corneal en el grupo tratado que correspondió al modelo de aplicación Iny-ASCs, la calcificación ya estaba presente antes de incluirse en el grupo de tratamiento.

4.3.3. NEOVASCULARIZACIÓN CORNEAL

No demostramos menor capacidad angiogénica si las ASCs se disponían en el sustrato de MA (MA-ASCs) respecto al modelo de aplicación inyección (Iny-ASCs).

El estudio de las medias estimadas de NVC para los dos grupos mostró que existía un incremento de NVC desde la semana basal en todas las exploraciones de ambos grupos, (Figura 30). Aunque los resultados presentaban mayor grado de NVC en el grupo inyección-ASCs respecto a grupo MA-ASC esta diferencia careció de significación estadística ($p>0,05\%$) (Tabla 19; Figuras 30 y 31).

GRUPO	BASAL	1SEM	2SEM	3SEM	4SEM
MA-ASCs	16,08±3,96	30,76±7,28	33,24±18,86	37,70±9,41	48,66±5,96
Iny-ASCs	23,47±11,47	36,13±16,45	41,07±19,28	48,80±21,76	54,65±28,08

Tabla 19. Media y desviación estándar del porcentaje de NVC en ojos tratados con ASCs según el modelo de aplicación y su evolución en el tiempo.

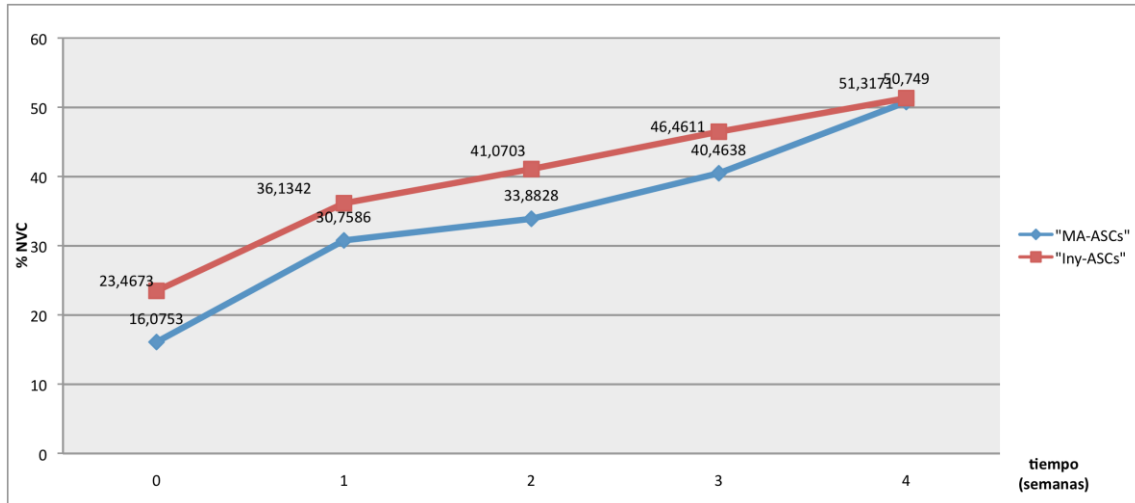


Figura 30. Medias estimadas del porcentaje de NVC y su evolución en ojos tratados con ASCs en sus dos modalidades de MA-ASCs e Iny-ASCs.

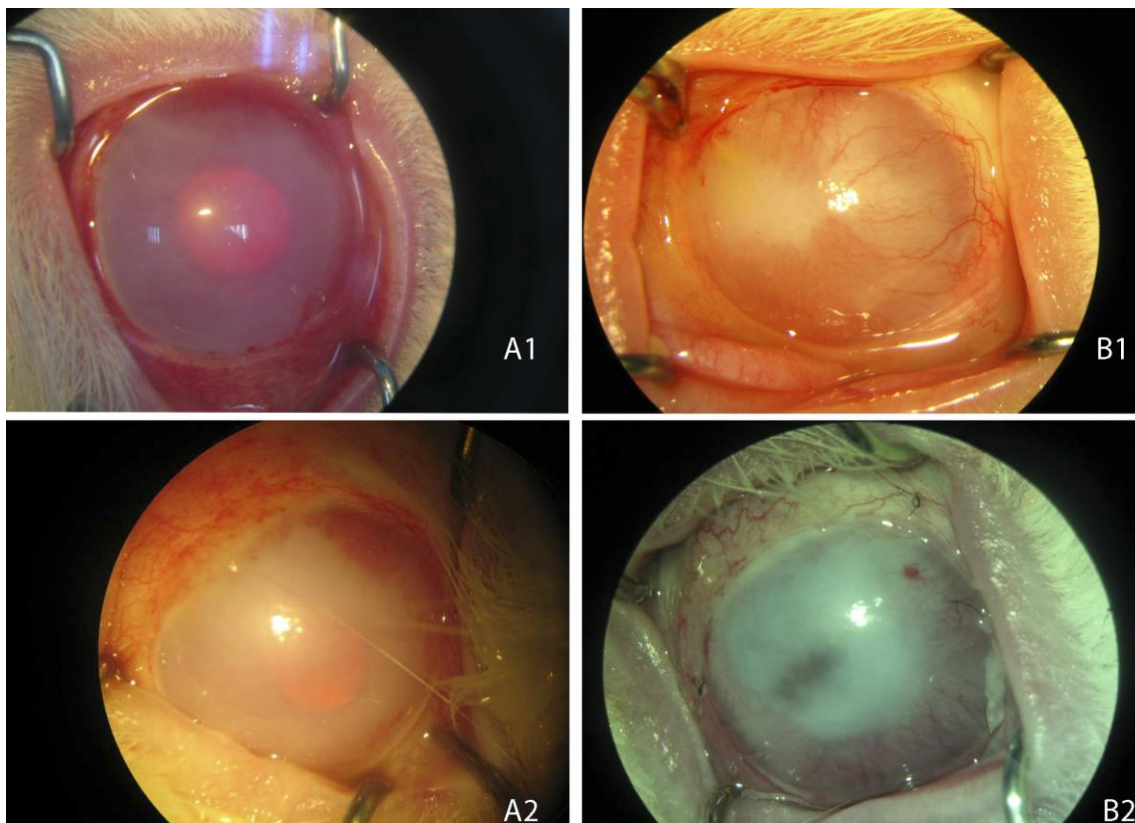


Figura 31. Se muestra la NVC en ojos tratados mediante ASCs. A: Procedimiento Iny-ASCs. A1: NVC en tiempos basales; A2: NV a las 4 semanas de la aplicación. B: Procedimiento MA-ASCs. B1: basal; B2: a las 4 semanas tras aplicación de implantes de MA-ASCs. En ambos procedimientos la NVC a las 4 semanas es superior a la ocurrida en etapas iniciales.

4.3.4. DEFECTO EPITELIAL

No encontramos que el defecto epitelial fuese menor en el grupo tratado mediante MA-ASCs.

Se observó un mismo comportamiento en cuanto a la epitelización en ambos modelos: un incremento en el porcentaje de DE desde su aplicación hasta las dos semanas de tratamiento. La reepitelización, que ocurría a partir de las dos semanas en ambos grupos, fue mayor entre las dos y tres semanas en el grupo inyección con tendencia a la significación estadística ($p=0,060$)* (Tabla 20; Figura 32).

GRUPO	BASAL	1SEM	2SEM	3SEM	4SEM
MA-ASCs	34,98±13,61	42,11±14,28	35,87±6,79	36,70±14,64	33,68±14,49
Iny-ASCs	32,81±10,95	37,39±19,22	42,31±26,28	29,64±14,65	31,43±19,14

Tabla 20. Media y desviación estándar del porcentaje de NVC en ojos tratados con ASCs según el modelo de aplicación y su evolución en el tiempo.

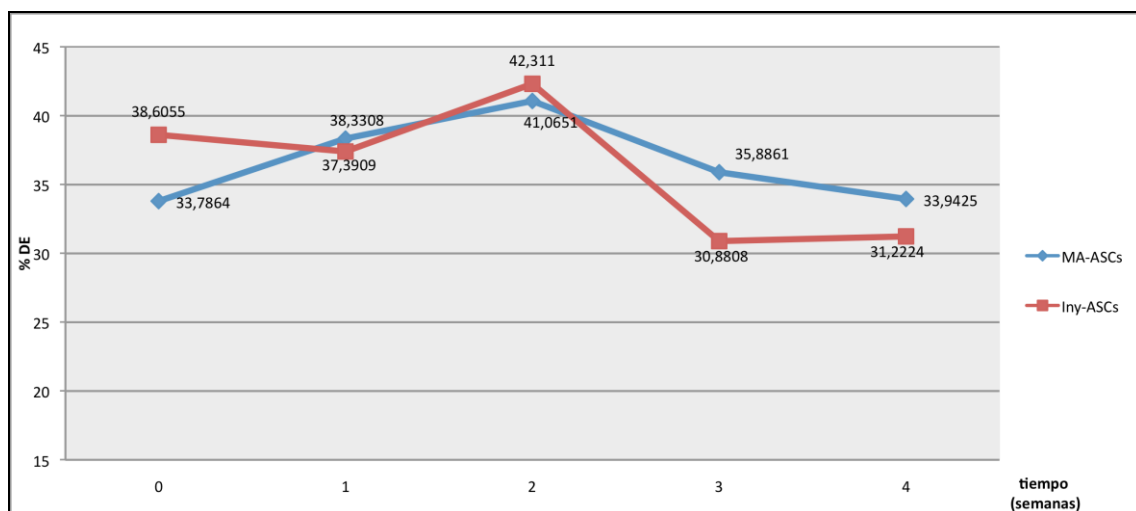


Figura 32. Medias estimadas del porcentaje de área DE en ojos tratados con ASCs en sus dos modalidades de MA-ASCs e Iny-ASCs y su evolución en el tiempo.

4.4. INFLUENCIA DE LA MEMBRANA AMNIÓTICA (MA VS INYECCIÓN DE SUERO SALINO)

Por último, quisimos testar la influencia de la MA en nuestro modelo experimental de causticación grave.

4.4.1. PERFORACIONES CORNEALES.

Los ojos donde se aplicó MA presentaron más perforaciones corneales , (4 de 8 ojos, 50%) que los del grupo inyección de suero salino (2 de 8 ojos, 25%) (Tabla 21). Las perforaciones ocurrieron a las dos semanas en cuatro ojos, correspondiendo 3 de ellos al grupo MA, y a las 4 semanas los dos restantes.

	SI PERFORACIÓN	NO PERFORACION	TOTAL
MA	4 (50%)	4 (50%)	8 (100%)
INY- SS	2(25%)	6 (75%)	8 (100%)
TOTAL	6 (37,5%)	10 (62,5%)	16 (100%)
Test de Fisher	0,304		

Tabla 21. *Distribución del evento perforación corneal en el grupo MA vs inyección de Suero Salino.*

4.4.2. CALCIFICACIONES CORNEALES

Las calcificaciones corneales fueron más frecuentes en el grupo inyección de Suero Salino (37,5%) que en el grupo MA (12,5%) (Tabla 22)

	SI CALCIFICACIÓN	NO CALCIFICACIÓN	TOTAL
MA	1 (12,5%)	7 (87,5%)	8 (100%)
INY- SS	3(37,5)	5 (62,5%)	8 (100%)
TOTAL	4 (25%)	12(75%)	16 (100%)
Test de Fisher	0,285		

Tabla 22. *Distribución del evento calcificación corneal en el grupo MA vs inyección de Suero Salino.*

4.4.3. NEOVASCULARIZACIÓN CORNEAL

El análisis comparativo de ambos grupos: inyección de suero salino a nivel limbar y el de aposición de MA, mostró la siguiente distribución de frecuencias en cuanto a NVC:

	BASAL	1SEM	2SEM	3SEM	4SEM
MA	16,29±9,31	24,04±18,79	40,47±18,31	44,96±24,53	56,74±26,34
INY-SS	25,42±8,11	32,82±13,80	37,82±16,69	38,03±16,69	46,85±20,18

Tabla 23. *Media y desviación estándar del porcentaje de NVC en ojos tratados con MA y mediante inyección de SS y su evolución en el tiempo.*

El análisis de medias estimadas por modelos mixtos ajustados a los datos de porcentaje de área de NVC en los dos grupos mostraron que la NVC en el grupo inyección fue mayor que en el grupo MA en la exploración basal y durante la primera semana ($p>0,05$). A partir de la segunda semana, la NVC se invirtió siendo superior en el grupo donde se había puesto MA respecto al grupo inyección de suero salino, aunque en ningún momento las diferencias entre ambos grupos mostraron significación estadística(Figura 33).

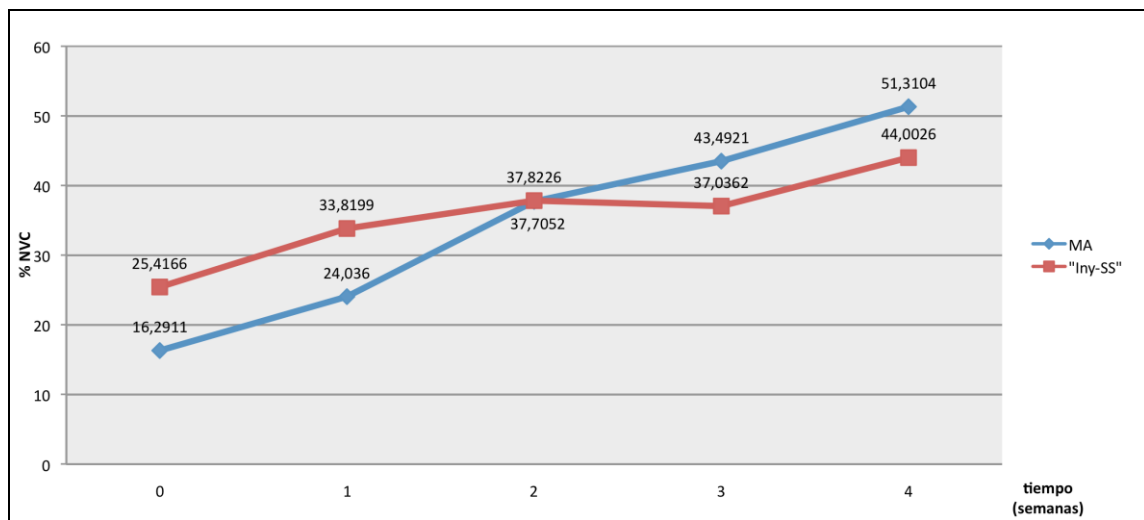


Figura 33. Medias estimadas del porcentaje de área de NVC en ojos con implantación de MA vs Inyección de Suero Salino y su evolución en el tiempo.

4.4.4. DEFECTO EPITELIAL

No se observó que el tamaño del DE en el grupo tratado con MA fuese menor respecto al grupo inyección de suero salino. (Tabla 24; Figura 34).

GRUPO	BASAL	1SEM	2SEM	3SEM	4SEM
MA	38,77±14,39	34,51±12,45	39,10±22,70	37,85±21,45	40,38±13
INY-SS	34,50±13,98	38,33±11,33	41,07±12,97	36,51±14,04	31,90±18,86

Tabla 24. Media y desviación estándar del porcentaje de área de DE en ojos tratados con MA y mediante inyección de SS y su evolución en el tiempo

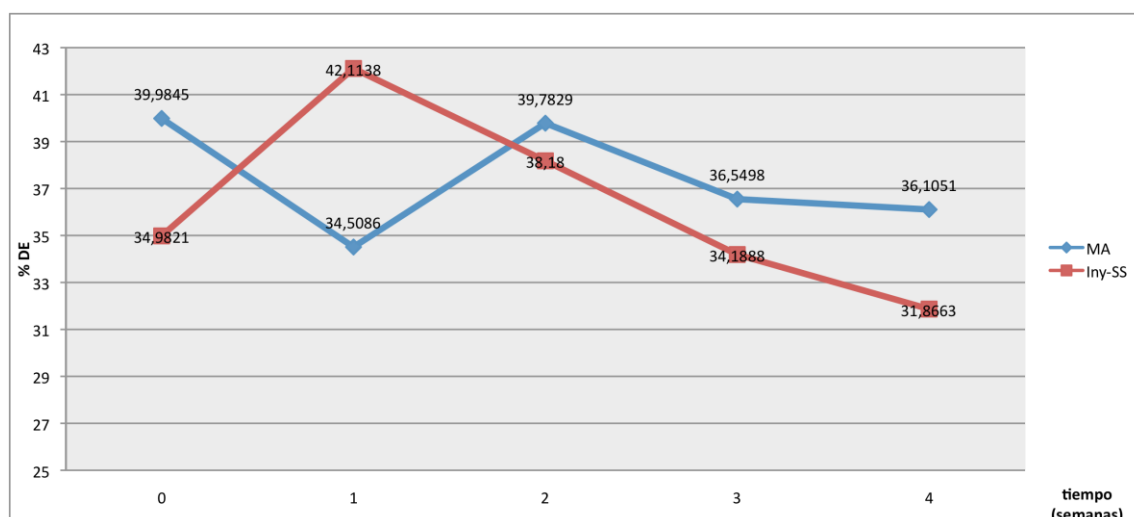


Figura 34. Medias estimadas del porcentaje de área de DE y su evolución en ojos con implantación de MA vs inyección de SS.

5. RESULTADOS HISTOLÓGICOS

Presentamos los resultados histológicos a las 4 semanas según el modelo de administración empleado.

5.1. GRUPO INYECCIÓN

5.1.1. CELULARIDAD INFLAMATORIA EN LIMBO Y CÓRNEA

Se analizaron el tipo de patrón inflamatorio y su grado sobre secciones histológicas corneales y limbares teñidas mediante hematoxilina-eosina a las 4 semanas de la inyección limbar de ASCs y de la inyección de Suero Salino (Iny-SS).

A nivel limbar, el patrón inflamatorio predominante en el grupo de ojos tratados mediante inyección de ASCs fue de tipo crónico (Figura 35; Tabla 25). En el 75% (6 de 8 ojos) se observó un infiltrado crónico a base de linfocitos y células plasmáticas. Un ojo (12,5%) mostró un patrón inflamatorio de tipo agudo, a expensas de leucocitos PMN, correspondiendo al ojo de evolución de dos semanas y en el 12,5% restante (1 de 8 ojos) se observó un patrón mixto a base de PMN y células plasmáticas. En cuanto al grado de inflamación la mayoría de los ojos, un 62,5% (5 de 8 ojos), presentaron inflamación leve y el 37,5% (3 de 8 ojos) inflamación moderada (Tabla 27).

El tipo de patrón inflamatorio del limbo a las 4 semanas en el grupo Iny-SS, fue de tipo crónico en el 100% (7 de 7 ojos evaluados,) a expensas de linfocitos y células

plasmáticas(Tabla 25). Respecto al grado de inflamación, excluyendo uno de los ojos perforados, donde no fue posible realizar los cortes histológicos por desestructuración del tejido, la inflamación más prevalente fue de tipo moderada en el 71,42% (5 de 7 ojos) y leve en el 28,57% (2 de 7 ojos) (Tabla 27).

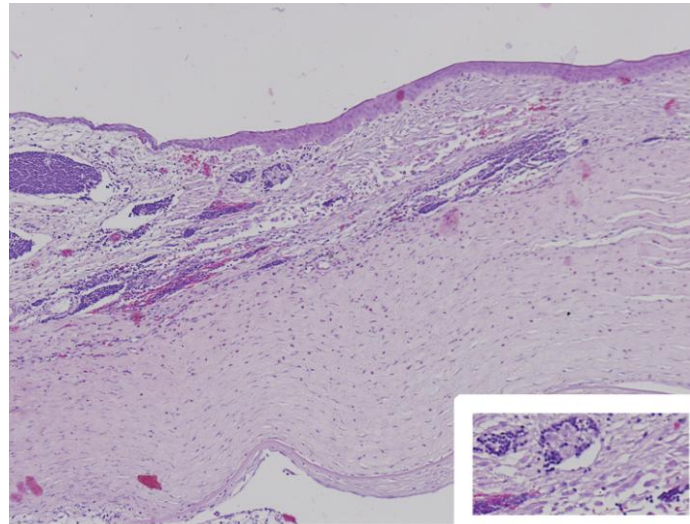


Figura 35. Sección histológica del limbo esclerocorneal, córnea y conjuntiva a las 4 semanas tras tratamiento mediante inyección de ASCs . Tinción hematoxilina-eosina(10x). Se muestra el patrón inflamatorio crónico en banda de grado leve a base de linfocitos tanto a nivel subconjuntival, como limbar y en córnea periférica. En la esquina inferior derecha a mayor aumento se puede apreciar la naturaleza linfocitaria del infiltrado.

A nivel corneal en el grupo de ojos tratados mediante inyección de ASCs no se observó una uniformidad en cuanto al tipo de patrón inflamatorio (Tabla 26). Uno de los ojos no pudo ser valorado por intensa desestructuración del tejido en la preparación de la muestra, por lo que se presentan los resultados de los 7 ojos restantes: El 42,85% (3 de 7 ojos) presentaron infiltrado inflamatorio de tipo crónico a base de células plasmáticas y linfocitos, el 28,57% (2 de 7 ojos) un infiltrado inflamatorio agudo, con PMN neutrófilos y otro 28,57% (2 de 7 ojos), un patrón mixto con PMN y células plasmáticas. El 85,71 % (6 de 7 ojos) mostraron inflamación moderada y un ojo inflamación de tipo leve (14,28%).

En los ojos del grupo Iny-SS predominaron los ojos con inflamación de tipo aguda (4 de 7 ojos), a base de PMN, en 1 ojo (14,28%) de tipo crónico y dos (28,57%) de carácter mixto (Tabla 26).

La inflamación fue severa en el 14,28% (1 de 7 ojos), en 57,14% (4 de 7 ojos) de tipo moderada: 57,14% y leve en 28,57% (2 de 7 ojos). El ojo con mayor grado de

inflamación correspondió al que presentó una perforación a las 4 semanas (Figura 36) (Tabla 27).

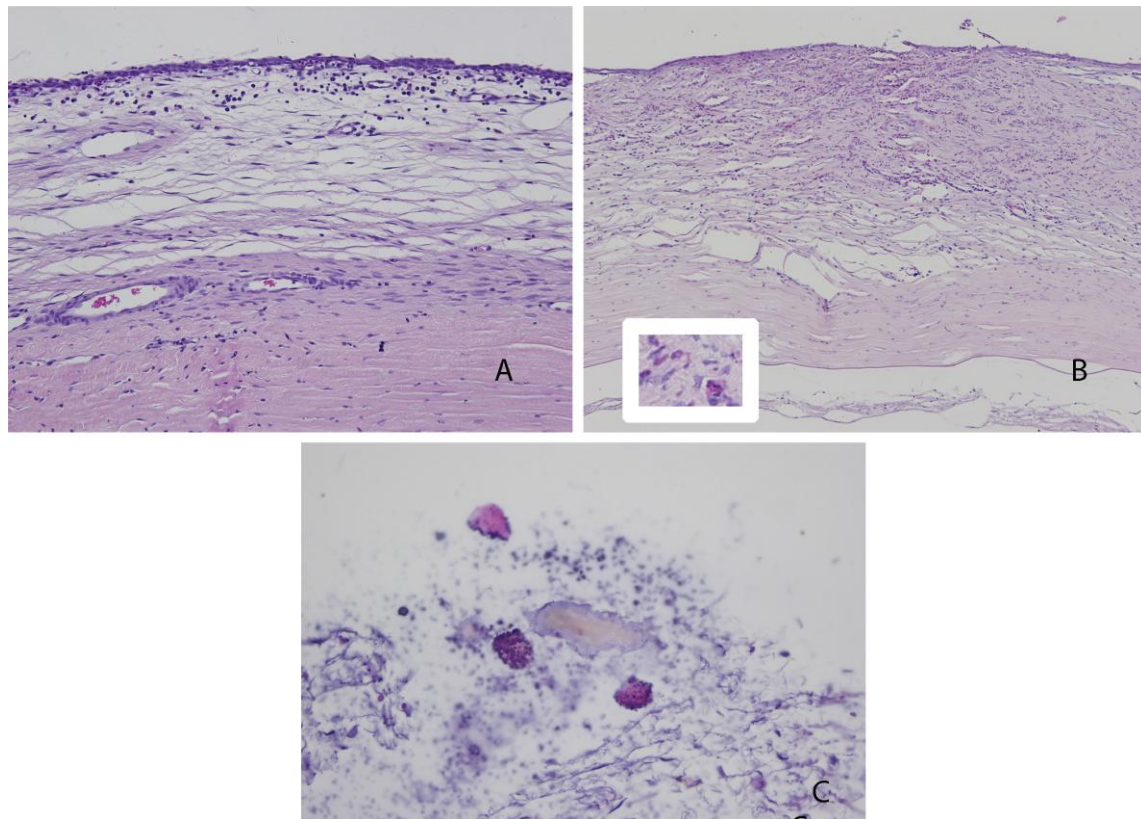


Figura 36. Fotografías que muestran el patrón inflamatorio en dos cortes histológicos corneales con tinción hematoxilina-eosina en ojos a 4 semanas. A: El corte corresponde a un ojo del grupo Iny-ASCs. Se observa un infiltrado inflamatorio crónico a base de mononucleares de grado leve. Se muestra un epitelio con escaso número de capas celulares (10x). B; Corte histológico corneal correspondiente a un ojo con Iny-SS. El grado de celularidad es moderado. En la esquina inferior izquierda revela a mayor aumento la inflamación de tipo aguda, a base de PMN neutrófilos (4x). C: Calcificaciones distróficas correspondientes al mismo ojo que B. (20x)

LIMBO	INFLAMACIÓN AGUDA	INFLAMACIÓN MIXTA	INFLAMACIÓN CRÓNICA
INY-ASCs	12,5%(1/8)	12,5% (1/8)	75% (6/8)
INY-SS	0%	0%	100% (7/7)

Tabla 25. Tipo de patrón inflamatorio a nivel del limbo en el grupo tratado mediante inyección de ASCs (Iny-ASCs) y en el grupo control (Iny-SS)a las 4 semanas.

CORNEA	INFLAMACIÓN AGUDA	INFLAMACIÓN MIXTA	INFLAMACIÓN CRÓNICA
INY-ASCs	28,57% (2/7)	28,57% (2/7)	42,85% (3/7)
INY-SS	57,14% (4/7)	28,57% (2/7)	14,28% (1/7)

Tabla 26. Tipo de patrón inflamatorio a nivel corneal en el grupo tratado mediante inyección de ASCs (Iny-ASCs) y en el grupo control (Iny-SS) a las 4 semanas.

CONEJO	LIMBO INY-ASCs		LIMBO INY-SS		CÓRNEA INY-ASCs		CÓRNEA INY-SS	
A	PMN y Pl	1+ (1+)	Pl	1+	PMN	2+ (3+)	PMN	2+
B	Pl	1+ (1+)	L	2+ (3+)	PMN	2+ (1+)	PMN	2+ -
C	L	1+ (1+)	L	2+ NA	Pl	2+ 1+	Pl	2+ NA
D	Pl	2+ -	Pl	2+ (1+)	Pl	1+ (1+)	PMN y Pl	2+ (2+)
E	Pl	1+ (2+)	Pl	1+ -	PMN y Pl	2+ (3+)	PMN	1+ (2+)
F	Pl	1+ (2+)	Pl	1+ (3+)	PMN y Pl	2+ (1+)	PMN	1+ (1+)
G (2s)	PMN	2+ (2+)	NA (perforación 2s)	2+	NA(AP no valorable)	3+	NA (perforación)	NA
H	L	2+ (3+)	Pl (perforación 4 s)	2+ (3+)	L	2+ (1+)	PMN,Pl (Perforación 4 s)	3+ (4+)

Tabla 27. Tipo celular y grado de inflamación en el limbo y en la córnea de ojos tratados mediante inyección de ASCs (Iny-ASCs) o de suero salino (Iny-SS). A excepción del ojo G, los resultados se presentan a 4 semanas. PMN: polimorfonucleares, Pl: células plasmáticas, L: linfocitos, NA: no aplicable. Los valores entre paréntesis representan los grados de fibrosis corneal. Grados de Inflamación y fibrosis: 1+: corresponde a leve, 2+: moderada, 3+: severo, 4+: muy severa.

5.1.2. FIBROSIS LIMBAR Y CORNEAL

Con el fin de determinar la existencia de fibroblastos y queratocitos activados, se realizó inmunotinción de α -actina. Los resultados mostraron que el grado de fibrosis en el lugar de inyección de las ASCs, esto es a nivel limbar, fue similar en ambos grupos, y de carácter moderado. A nivel corneal el grado de fibrosis severa fue más manifiesto en el grupo tratado con ASCs (Figura 37).

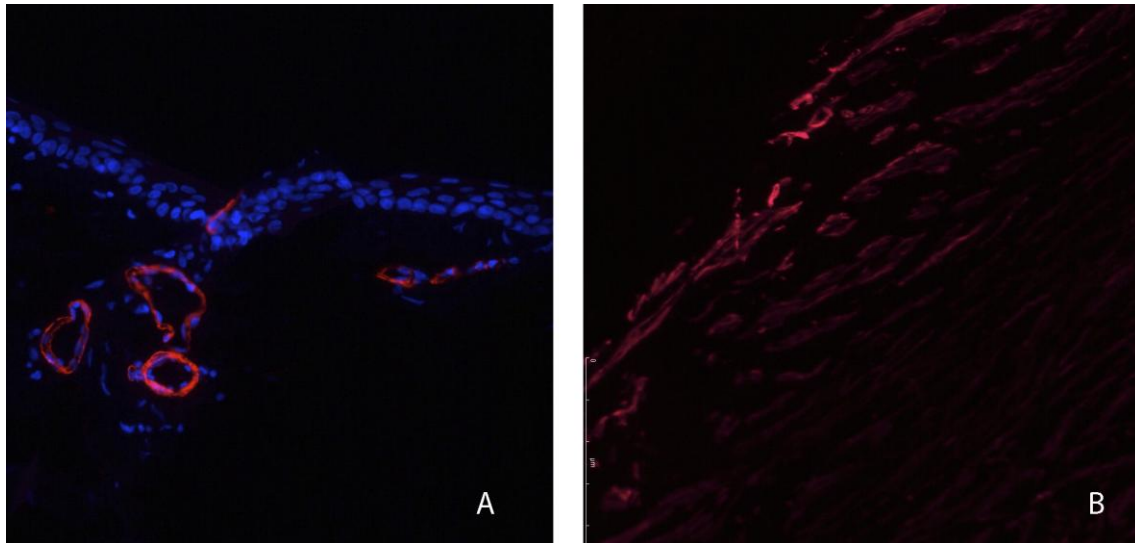


Figura 37. Visualización de la expresión de α -actina a nivel limbar. Microscopía de fluorescencia. A: Expresión de α -actina (rojo) en un limbo de un ojo normal (20x). La α -actina se localiza alrededor de los vasos limbares. Los núcleos marcados con DAPI aparecen en azul. B: Expresión de α -actina en limbo de un ojo tratado mediante inyección de ASCs. Se observan trazas dispuestas en el espesor del espacio limbar.(10x).

5.1.3. VALORACIÓN CÉLULAS CALICIFORMES: TINCIÓN PAS

Con el objetivo de conocer el fenotipo del epitelio corneal resultante, se procedió a la identificación de las células caliciformes también llamadas de goblet, propias del epitelio conjuntival, sobre la superficie corneal. Para ello, se utilizaron técnicas de tinción con PAS y se analizaron las secciones histológicas corneales, revelando la existencia de células caliciformes en 3 de 8 ojos tratados (37,5%) y en 2 de 7 ojos controles (28,57%), confirmando el fenotipo conjuntival que epitelizaba la superficie corneal dañada. (Figura 38).

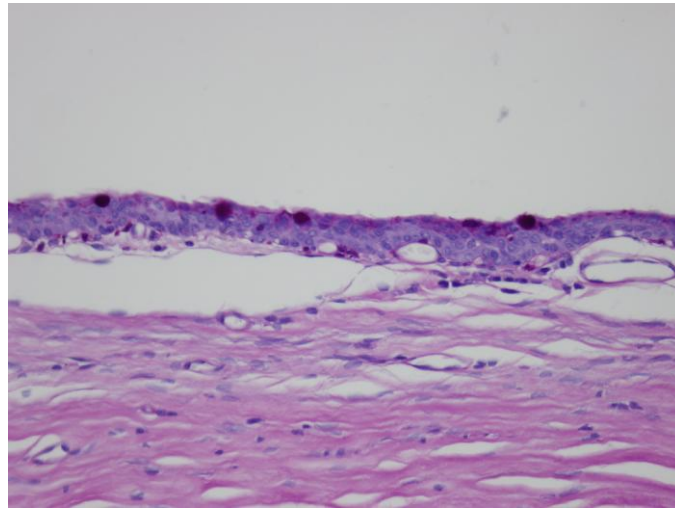


Figura 38. Corte histológico corneal con tinción PAS en un ojo con aplicación de Iny-ASCs. Se observa la existencia de células caliciformes en el epitelio corneal. (40x).

5.1.4. VALORACIÓN DEL FENOTIPO EPITELIAL CORNEAL: CK3.

Para determinar si el epitelio resultante era de tipo corneal o conjuntival, se determinó mediante inmunotinciones, la existencia de la citoqueratina específica del epitelio corneal, esto es, la CK3. De todos los ojos tratados mediante inyección de ASCs, sólo 1 (12,5%) evidenció citoqueratina CK3, expresión de un epitelio fenotípicamente corneal. Se observó un patrón CK3 paracentral superficial en 2 de 8 ojos control (25%) (Figura 39).

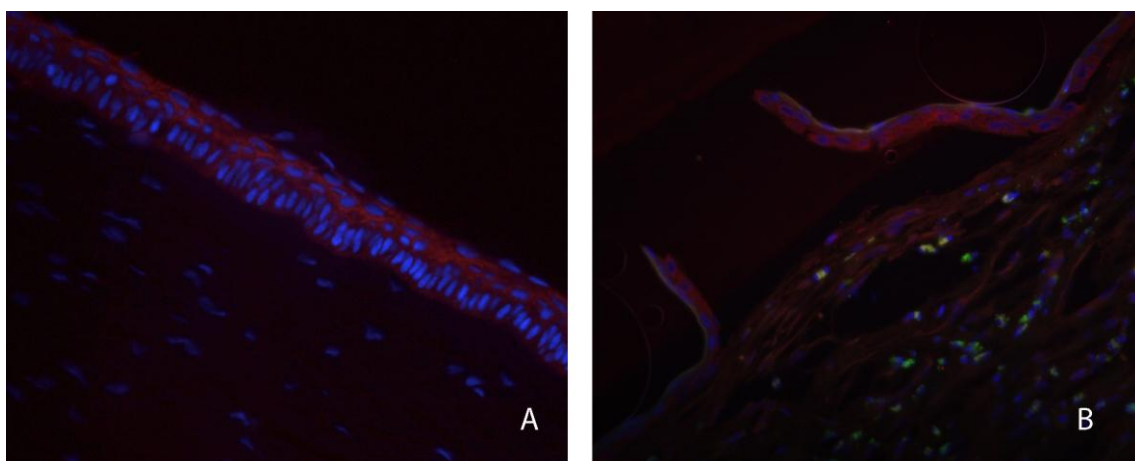


Figura 39. Visualización de la expresión de CK3 en células epiteliales corneales mediante microscopía de fluorescencia. A: en un ojo sano. B: en el único ojo tratado mediante inyección de ASCs donde la tinción fue positiva para CK3. En ambas fotografías las células epiteliales son positivas para este filamento intermedio y se visualizan en rojo; los núcleos, marcados con DAPI, se visualizan en azul.

5.2. GRUPO MEMBRANA AMNIÓTICA

5.2.1. CELULARIDAD INFLAMATORIA EN LIMBO Y CÓRNEA

De la misma manera que en el grupo inyección, se analizaron el tipo de patrón inflamatorio y su grado en el modelo de aplicación de implantes de MA-ASCs frente a la aplicación de MA tanto en limbo como en córnea.

La existencia de perforación corneal en 4 de los 8 ojos del grupo MA y en uno de 8 del grupo MA-ASCs, llevó a la necesidad de sacrificio del animal en el momento de la perforación, lo que nos permitió el estudio del ojo adelfo en distintos tiempos evolutivos. Algunos de los ojos perforados estaban muy desestructurados y no fue posible realizar los cortes histológicos.

Se presentan los resultados histológicos del limbo y córnea de 4 ojos del grupo MA a las cuatro semanas y de 8 ojos correspondientes al grupo MA-ASCs en distintos tiempos.

A **nivel limbar**, en el grupo MA-ASCs, los hallazgos histológicos variaron según el momento evolutivo (Tabla 28). El patrón inflamatorio en el ojo analizado a la semana del tratamiento contrariamente a lo esperado evidenció un infiltrado celular inflamatorio de tipo crónico y grado moderado a base de células plasmáticas en uno de los limbos (12,5%). A las dos semanas, la histología de otro ojo evaluado (12,5%) mostró un patrón agudo de grado leve a expensas de PMN. En la semana tercera se evidenció un patrón de infiltración crónica con linfocitos y células plasmáticas de grado leve en otro ojo (12,5%). A las cuatro semanas, dos ojos (25%) mostraron inflamación crónica a base de linfocitos y células plasmáticas con carácter moderado y tres ojos (37,5%) inflamación de tipo mixto, dos de ellos severa y otro muy severa, correspondiendo al único ojo perforado del grupo tratado con MA-ASCs (Figura 40).

Respecto al grupo MA, los resultados histológicos a las 4 semanas mostraron a nivel del limbo inflamación de tipo crónico en 2 de 3 ojos (66,66%) y mixto en 1 de 3 ojos (33,33%). Los grados fueron leve, moderado y severo en cada uno de los tres ojos.

Por tanto, a nivel limbar, a las 4 semanas, no se observaron diferencias en el patrón inflamatorio, que fue de tipo crónico en ambos grupos. No fue posible establecer diferencias en cuanto el grado de inflamación debido a la escasez de muestras limbares evaluadas en el grupo MA.

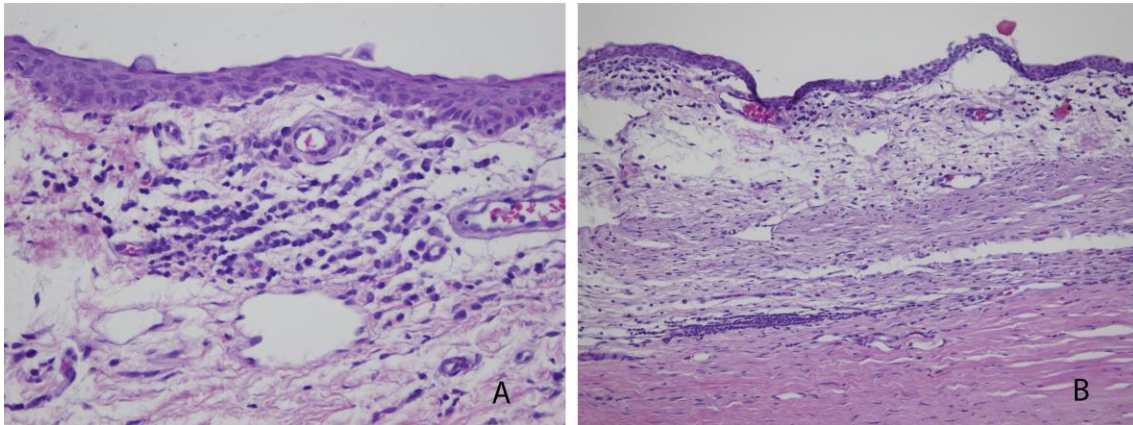


Figura 40. Se muestra el patrón inflamatorio de ojos tratados mediante MA-ASCs a nivel del limbo en secciones histológicas teñidas con hematoxilina-eosina a A: 3 semanas y B: 4 semanas de tratamiento. En ambos casos se observa un patrón inflamatorio moderado de tipo crónico a base de linfocitos y células plasmáticas.

A nivel corneal en el grupo MA-ASCs, el ojo perforado de este grupo mostró inflamación de tipo mixto y grado muy severo (14,28%) mientras que el 85,71% restante (6 de 7 ojos) presentaban inflamación de predominio agudo, a base de PMN y el grado oscilaba desde inflamación severa en un ojo , (12,5%), moderada en el 25% (2/7ojos) y leve en 37,5% (3 de 7 ojos) (Tabla 28).

De los cuatro ojos con muestras evaluables del grupo MA, a las cuatro semanas, el 75% (3 de 4 ojos) presentaban patrón inflamatorio de tipo agudo, y 25% (1 de 4 ojos) de tipo mixto. A las cuatro semanas ninguno de los ojos presentaba inflamación de tipo leve, el 50% inflamación moderada y 50% de grado severa (Figura 41).

En córnea, en ambos grupos la inflamación fue de tipo agudo, a base de PMN, independientemente del tipo evolutivo. Aunque no podemos observar diferencias en cuanto al grado de inflamación entre ambos grupos por la diversidad de la muestra, los grados de inflamación de tipo leve sólo se registraron en córneas con aplicación de ASCs.

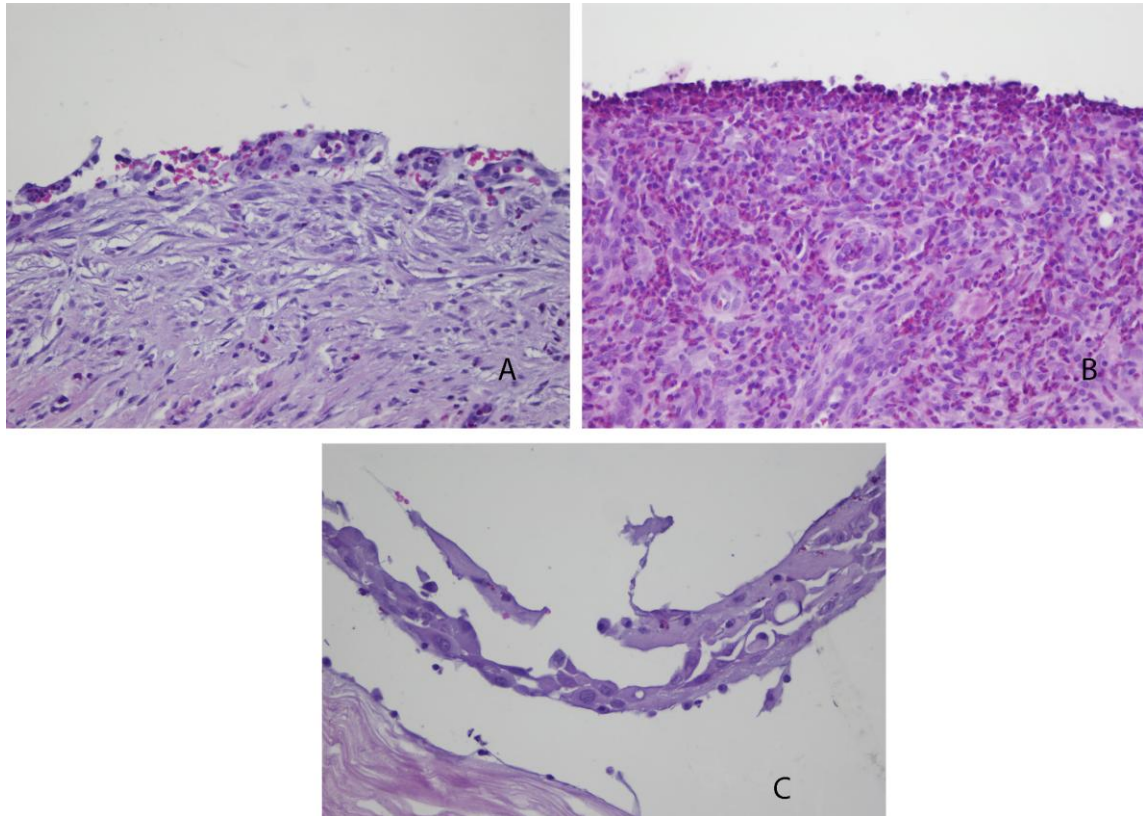


Figura 41. Se muestra el patrón inflamatorio de dos secciones histológicas corneales teñidas con hematoxilina-eosina en dos ojos a las 4 semanas del procedimiento. A: Patrón inflamatorio de tipo mixto y grado leve a base de linfocitos y PMN. Corresponde a un ojo tratado con MA-ASCs . Se aprecian eritrocitos extravasándose de los vasos sanguíneos. (20x). B: Patrón inflamatorio de tipo agudo y grado severo en un ojo del grupo MA (20x). C: A las 4 semanas, aunque clínicamente no se observaba la MA, microscópicamente se aprecian las células epiteliales de la misma. Corresponde a un ojo MA-ASCs.

ojo	Limbo Grupo MA-ASC		Limbo Grupo MA		Córnea Grupo MA-ASC		Córnea Grupo MA	
A (1 s)	Pl	2+ (2+)	NA (Perforado)		PMN	1+ (3+)	NA (Perforado)	
B	PMN y Pl	3+	NA		PMN	2+ (3+)	PMN	3+ (2+)
C (3 s)	Pl y L	1+	NA (Perforado)		PMN	2+ (2+)	NA (Perforado)	2+
D	PMN y L (Perforado)	4+ (3+)	2 PMN y L	2+ F2+	PMN y L (Perforado)	4+ (3+)	PMN	3+ (1+)
E (2 s)	PMN	1+ (3+)	NA (Perforado)		PMN	1+ (2+)	NA (Perforado)	
F	Pl	1+	Pl	1+	PMN	1+ F3+	PMN y L	2+ F1
G	PMN y Pl	3+ (1+)	NA (Perforado)		PMN	3+ (3+)	NA (Perforado)	
H	2+ /L	2+	L	3+	NA		PMN	2+ (1+)

Tabla 28. Tipo celular y grado de inflamación en cornea y limbo en ojos del grupo MA-ASCs y en el grupo MA. Los resultados son a 4 semanas, salvo los ojos A, C, E, que se exponen en los tiempos indicados en semanas (s). PMN: polimorfonucleares, Pl: células plasmáticas, L: linfocitos, NA: no aplicable. Grados de Inflamación y fibrosis: 1+: leve, 2+: moderada, 3+: severa, 4+: muy severa. Entre paréntesis se muestran los grados de fibrosis.

5.2.2. FIBROSIS LIMBAR Y CORNEAL

La inmunodetección de α -actina permitió evaluar la existencia de fibroblastos activados y con ello la fibrosis limbar y corneal activa.

Nuestros resultados mostraron que la fibrosis a nivel corneal fue más intensa en los ojos que habían sido tratados mediante ASCs sobre MA. Dada la escasez de limbos valorables en grupo MA, no se pudieron establecer diferencias en cuanto a la fibrosis a nivel del limbo entre ambos grupos (Tabla 28; Figura 42).

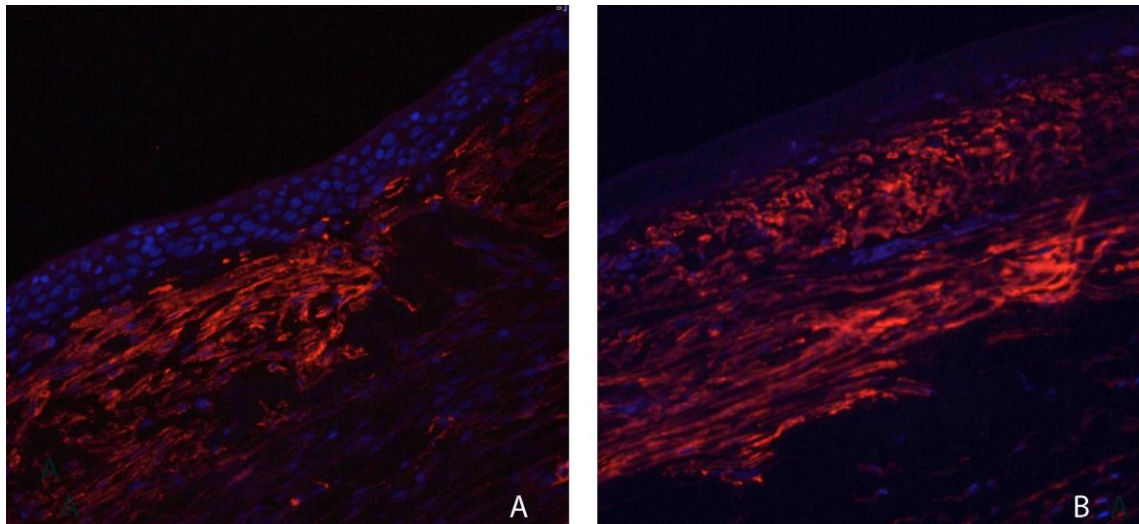


Figura 42. Visualización de la expresión de α -actina en A: limbo y B: córnea de un ojo tratado mediante MA-ASCs. Microscopía de fluorescencia. La expresión de α -actina(rojo) representa los queratocitos activados en el estroma limbar y en estroma corneal. Los núcleos marcados con DAPI pueden verse en azul. Se observa la intensa fibrosis en el estroma corneal y limbar.

5.2.3. VALORACIÓN DE CÉLULAS CALICIFORMES: PAS

Al sacrificio observamos ojos con células PAS+ en 2 de 7 ojos tratados mediante MA-ASCs (28,57%) y en 3 de 5 ojos del grupo MA (60%).

5.2.4. VALORACIÓN DEL FENOTIPO EPITELIAL: CK3

La demostración de CK3, expresión del epitelio de tipo corneal al sacrificio, se observó en 1 de 8 ojos del grupo MA (12,5%) y en 1 de 8 ojos tratados mediante MA-ASCs (12,5%).

DISCUSIÓN

En este estudio se ha examinado la influencia de las células madre mesenquimales derivadas de la fracción vasculoestromal de la grasa en el tratamiento de la fase aguda de una quemadura ocular, su capacidad para evitar las graves complicaciones derivadas de ésta y su influencia en la regeneración de una superficie corneal viable.

La utilización de la Terapia Celular como terapia regenerativa a nivel de superficie ocular se viene utilizando con éxito en pacientes desde los primeros trabajos de Pellegrini en 1997 (Pellegrini, Traverso et al., 1997). A pesar de los buenos resultados, la expansión de células madre epiteliales procedentes del limbo en la regeneración de la superficie ocular tiene una serie de limitaciones como son la falta de acción antiinflamatoria o la imposibilidad de aplicación en casos de afectación bilateral.

En los últimos años, algunos estudios animales se han centrado en el papel de las células troncales mesenquimales como fuente regeneradora de la superficie ocular y su influencia sobre la inflamación. Un aspecto importante de este tipo de células es la ausencia de rechazo, lo cual las hace idóneas para un tratamiento alogénico. La fuente celular utilizada en la mayoría de los casos ha sido la médula ósea (Gu, Xing et al., 2009, Ma, Xu et al., 2006, Oh, Kim et al., 2008, Reinshagen, Auw-Haedrich et al., 2009, Yao, Li et al., 2012, Ye, Yao et al., 2006). Sin embargo, el tejido adiposo constituye una fuente alternativa de células madre mesenquimales y tiene entre sus ventajas sobre las derivadas de médula ósea, su fácil accesibilidad y el mayor rendimiento, como se comentó con detenimiento en la introducción de este trabajo.

1. EVALUACIÓN DEL MODELO EXPERIMENTAL

Para poder establecer comparaciones entre los resultados de nuestra serie y los trabajos publicados en la literatura se debe tener en cuenta el modelo de daño experimental aplicado, el grado de causticación así como la especie animal empleada (Tabla 29).

El modelo experimental de causticación que utilizamos en nuestros experimentos fue realizado sobre conejos albinos inmunocompetentes. La evidencia actual sugiere que las células ASCs alogénicas tienen características inmunorreguladoras (Puissant, Barreau et al., 2005, Salem and Thiemermann, 2010). Por este motivo, en nuestro grupo de experimentos se utilizaron animales inmunocompetentes frente a animales inmunodeprimidos, que son los que clásicamente se utilizan cuando se realizan alotrasplantes.

Se han descrito patrones de respuesta a tratamiento diferentes según el animal empleado. En este sentido, el estudio de Yao realizado en ratas, demuestra una disminución de la vascularización y opacidad más precoz que los descritos en conejos tras implantes de MSCs (Yao, Li et al., 2012). En ausencia de estudios comparativos entre especies, no podemos asegurar que el comportamiento de las MSCs sea menos exitoso en conejos respecto a ratas, puesto que varios factores como son la dosis de las células madre empleadas, la forma de aplicación de las mismas, o la intensidad del daño, difieren entre estos estudios, influyendo en los resultados.

Uno de los factores más importantes en la interpretación de los resultados y la extrapolación de los mismos a la práctica clínica es el modelo de daño. Anteriormente a este trabajo habíamos realizado estudios de causticación a dosis y tiempos decrecientes de NaOH hasta que logramos un modelo de causticación reproducible en nuestro medio. Este trabajo fue presentado en la suficiencia investigadora de uno de los colaboradores de nuestro grupo.

A pesar de utilizar el caústico a menor concentración y durante menos tiempo que hasta lo ahora descrito en la literatura, nuestro modelo de daño generado fue muy agresivo y los signos clínicos pudieron manifestarse más precozmente que en otros modelos animales. Esto se podría explicar por la ausencia de membrana de Bowman en el ojo del conejo (Davis, 1929).

Estudio	Especie Animal	Sustancia	Tiempo	Resultado	Comentario
(Song, Yang et al., 2005)	40 ojos de Rata	½M NaOH	30 seg	Todas las corneas mostraron signos de Insuficiencia Límbica	
(Jang, Ahn et al., 2006)	36 ojos de Conejos	1N NaOH,	30 seg		
(Yang, Moldovan et al., 2008)	26 ojos Cabras	1N NaOH	No descrito		Queratectomía previa
(Luengo Gimeno, Lavigne et al., 2007)	14 ojos de conejos	1M NaOH	60 seg	Todos mostraron signos de Insuficiencia Límbica	
(Hirst, Kenyon et al., 1981)	2 ojos de mono 4 ojos de conejo	4N NaOH	60 seg	Todos mostraron signos de Insuficiencia Límbica	Un ojo de un mono evolucionó a Descematocele
(Du, Chen et al., 2003)	20 ojos de conejos	1N NaOH	30 seg	Todos mostraron signos de Insuficiencia Límbica	Desepitelización mecánica posterior a causticación por quemadura química
(Ti, Anderson et al., 2002)	52 ojos de conejos	1-n-heptanol	No descrito	Todos mostraron signos de Insuficiencia Límbica	Desepitelización y 360° queratectomía lamelar del área limbar. Citología de impresión confirmó IL.
(Daniel Ramos Parente, 2002)	18 ojos de conejos	1-n-heptanol	5 min	Todos mostraron signos de Insuficiencia Límbica	Insuficiencia limbar parcial y de <intensidad que técnicas que incluyen desepitelización o queratectomía lamelar

Tabla 29. *Trabajos publicados en la literatura donde se muestran distintos modelos animales de insuficiencia límbica generados por causticación química.*

Las citologías de impresión confirmaron la existencia de insuficiencia límbica en el 100% de los ojos, demostrando metaplasia escamosa severa en alguna de las dos hemicórneas de todos los ojos. Pensamos que la ausencia de epitelio ocasionada por la

causticación en el momento de la toma de muestras citológicas puede explicar que la citología fuera negativa en determinados cuadrantes. Por otro lado, la exploración biomicroscópica de la córnea demostró crecimiento de un tejido fibrovascular desde el limbo en todos los cuadrantes corneales, hallazgo que corrobora que el daño que se produjo fue de insuficiencia límbica total y no parcial.

La existencia de células caliciformes obtenida en las citologías de impresión realizadas sobre córnea fue menos frecuente que el hallazgo de metaplasia escamosa de grado grave. Estos hallazgos concuerdan con los trabajos de López-García y Rivas (López-García, Rivas et al., 2006) que demuestran la existencia de metaplasia escamosa como signo de mayor sensibilidad para el diagnóstico de insuficiencia límbica y la existencia de células caliciformes confiere el carácter de gravedad de la misma, indicando diferenciación conjuntival. Por otra parte, está descrito que en la córnea del conejo, las células caliciformes que han migrado desde la conjuntiva a la superficie corneal desaparecen pasadas dos semanas (Auw-Haedrich, Agrawal et al., 2011, Reinshagen, Auw-Haedrich et al., 2009, Wei, Wu et al., 1993), lo cual significa que estas células no son un buen marcador para la evaluación de insuficiencia límbica en el conejo, a diferencia de lo que ocurre en humanos.

Por último, la máxima limitación de nuestro estudio lo constituye el número del tamaño de la muestra. Pese a que el tamaño muestral fue determinado previamente al diseño de los experimentos, se produjo una pérdida de sujetos a lo largo del estudio. Posiblemente habríamos alcanzado resultados más rotundos con un número de casos superior.

2. DETERMINACIÓN DE ASCs EN LOS IMPLANTES E INMUNOLocalIZACIÓN OCULAR.

Los análisis de citometría de flujo e inmunofluorescencia confirmaron in vitro la expresión de GFP y el fenotipo de las ASCs que posteriormente aplicaríamos en los procedimientos de inyección y de implante de membrana amniótica. Para valorar la presencia de las ASCs en el tejido ocular se realizaron estudios de inmunodetección al sacrificio del animal. Se identificaron ASCs en el modelo inyección a las 24 horas de su aplicación confirmando que la administración era factible, sin embargo, no se detectaron en tiempos más tardíos. Respecto al procedimiento en que se aplicaban con sustrato de membrana amniótica, las células marcadas con GFP fueron identificadas a las 2 y a las 4 semanas.

Está descrita la viabilidad de las ASCs en el tejido ocular hasta 10 semanas, concretamente aplicadas en bolsillos corneales estromales (Arnalich-Montiel, Pastor et al., 2008). La no detección de ASCs a nivel perilimbar en nuestro grupo de experimentos podría explicarse por su falta de viabilidad in vivo a ese nivel, debido a una falta de condiciones ambientales favorables.

En cuanto al mecanismo de acción de las MSCs sobre las células madre del limbo, por lo que existe en la literatura, y basados en la acción de las LMSCs identificadas a nivel del limbo (Polisetty, Fatima et al., 2008) las ASCs a través de mecanismos paracrinós mediante la secreción de factores de crecimiento e interleukinas, estimularían las células limbares remanentes en una fase precoz tras su administración (Daya, Watson et al., 2005, Gu, Xing et al., 2009, Jiang, Cai et al., Zhang, Sun et al., 2010). Este *turnover* de las ASCs explicaría la necesidad de aplicación de una segunda dosis de repetición.

En cuanto a la bioseguridad, las células utilizadas en nuestro grupo de experimentos se encontraban en pases 8-9. Esto supone pases avanzados, con menos capacidad de diferenciación que pases más precoces y con riesgo de transformación celular hacia la malignidad. No obtuvimos ninguna reacción adversa ni formación de tumores en nuestro modelo animal, si bien el tiempo de sacrificio fue a 4 semanas.

3. EVALUACIÓN CLÍNICA

3.1. NEOVASCULARIZACIÓN CORNEAL

El curso de la NVC de nuestro modelo animal no ha sido modificado por el trasplante o inyección de ASCs, ni por el trasplante de membrana amniótica.

Las evidencias actuales demuestran la actividad angiogénica de las MSCs cuando se aplican en otros tejidos de órganos distintos a los oculares (García-Gómez, Elvira et al., 2010, Ghajar, Blevins et al., 2006). Más aún, esta actividad proangiogénica en otros tejidos se considera beneficiosa porque promueve el cierre de fístulas anales o vaginales.

Sin embargo, su comportamiento cuando se administran sobre la córnea es controvertido. Con respecto a los resultados de la expansión de líneas epiteliales limbares, en ningún caso han logrado inhibir la NVC a largo plazo y de forma

definitiva. Más aún, está demostrada la capacidad angiogénica de los trasplantes de mucosa oral (Inatomi, Nakamura et al., 2006, Nakamura, Takeda et al., 2011).

La respuesta normal de la córnea tras una causticación severa en ojos que no reciben tratamiento alguno, consiste en la neoformación de vasos corneales, con una tendencia ascendente cuya pendiente y congestión clínica disminuye a partir de la segunda semana (Oh, Kim et al., 2008, Yao, Li et al., 2012, Ye, Yao et al., 2006).

En nuestra serie coincidimos con la observación de este mismo patrón en ojos sin administración de ASCs, aunque también observamos un patrón similar en ojos en los que habíamos aplicado ASCs mediante cualquiera de sus dos modalidades.

Los resultados publicados por varios autores (Oh, Kim et al., 2008, Ye, Yao et al., 2006) coinciden en la tendencia proangiogénica corneal inicial de las MSCs. Sin embargo, muestran un patrón angiogénico transitorio, con un pico a los 14 días, y posterior remisión. Los experimentos de Yao (Yao, Li et al., 2012), que utiliza inyección subconjuntival de MSCs, describen el efecto antiangiogénico desde etapas aún más iniciales, con menor NVC en el grupo MSCs a 3 y 7 días de su aplicación comparándolo con un grupo control.

En nuestros experimentos, el curso de la NVC tras causticación no pareció verse influenciado por la aplicación de ASCs, ya que no observamos la regresión de los vasos a partir de los 14 días apreciada en otros estudios (Oh, Kim et al., 2008). Esto podría ser explicado por la necesidad de aplicación de una segunda dosis de ASCs, en cualquiera de las dos modalidades de administración o que fuese necesario una dosis inicial mayor de las 1.6×10^6 células administradas en el grupo inyección ó 1×10^6 de células en el procedimiento MA. El trabajo de Yao (Yao, Li et al., 2012), que también utiliza el modelo inyección en su aplicación, utiliza una única dosis de 2×10^6 y además, el modelo de causticación está hecho sobre ratas, lo que supone una superficie corneal inferior, comparada con la del ojo del conejo.

Respecto a cómo se explica en la córnea el efecto antiangiogénico de las MSCs, los estudios publicados atribuyen este efecto a las citoquinas antiinflamatorias que las MSCs secretan, concretamente, la tromboespondina 1 (TSP-1) y la Metaloproteasa 2 (MMP-2). La TSP-1, un potente factor antiangiogénico cuyo mecanismo de acción es la apoptosis de las células endoteliales, alcanza niveles altos en córneas causticadas tratadas con MSCs o con el medio condicionado de MSCs (Oh, Kim et al., 2008). La MMP-2, un factor proangiogénico relacionado con la inflamación disminuye en ojos tratados con MSCs (Oh, Kim et al., 2008) (Ma, Xu et al., 2006). En cuanto al factor de

crecimiento del endotelio vascular (VEGF), un potente factor proangiogénico que aparece aumentado en modelos de isquemia tratados con MSCs (García-Gómez, Elvira et al., 2010), algunos estudios demuestran que aplicadas en cornea, los niveles no son superiores respecto a ojos controles (Oh, Kim et al., 2008), pudiendo ser incluso menores (Yao, Li et al., 2012).

Evaluando el efecto de la MA sobre la angiogénesis corneal, la MA se utiliza rutinariamente en la práctica clínica como tratamiento en causticaciones y en insuficiencia de células madre limbares de distinto origen, no sólo porque aporta una membrana basal nueva que facilita la migración de células epiteliales y acelera el cierre del defecto epitelial, sino también por su capacidad de secretar factores antiangiogénicos y antiinflamatorios.

La acción antiangiogénica de la MA está demostrada y se explica por varios componentes como por la endostatina, o la tromboespondina, (procedente fundamentalmente de las células epiteliales y en menor medida del estroma), el antagonista del Receptor de IL-1, (IL-1ra) y la IL10 (Ma, Chen et al., 2009). De todos, la endostatina es el más conocido; corresponde a un fragmento de 20 kDa procedente de la proteólisis del colágeno tipo XVIII, presente en la membrana basal de la MA. Los mecanismos antiangiogénicos de la endostatina surgen por su acción apoptótica sobre las células endoteliales, e inhibición de la proliferación y la migración de las células endoteliales. Aunque no se une a los Receptores de VEGF, inhibe la fosforilación tirosina kinasa inducida por el VEGF, bloqueando también su acción (Hao, Ma et al., 2000).

En todos los grupos de nuestros experimentos observamos un incremento de NVC desde la primera semana tras causticación, salvo en el grupo en que utilizábamos sólo la MA, en el que esta tendencia se retrasaba hasta la segunda semana. Cabe decir, que la acción antiangiogénica de la MA no se ponía de manifiesto si se aplicaba junto con ASCs ni siquiera en la primera semana.

Esta falta de efecto antiangiogénico en el grupo MA podría ser explicada por varios factores: inicialmente porque hay un aumento de factores angiogénicos en respuesta a los puntos de sutura de la MA (Ti, Anderson et al., 2002). Por otra parte, como se explicará más adelante, los ojos del procedimiento de aplicación con MA presentaron paradójicamente mayor inflamación, lo que justifica la mayor angiogénesis corneal. Esta inflamación podría ser debida a que la MA utilizada provenía de placentas humanas y fue empleada sin denudar, es decir, preservando sus células epiteliales. Estamos realizando por tanto, un xenoinjerto con existencia de células epiteliales en la

superficie ocular del conejo, lo que podría aumentar la respuesta inflamatoria y secundariamente la NVC. Por último, en causticaciones graves, está demostrado que la MA no es superior al tratamiento médico, en cuanto a la mejora de agudeza visual, reducción de simbléfaron y disminución de NVC, lo que en definitiva explicaría la falta de eficacia en este grupo de experimentos por el grado de causticación tan intenso (Lopez-Garcia, Rivas et al., 2005, Tamhane, Vajpayee et al., 2005).

3.2. DEFECTO EPITELIAL

Las ASCs aceleraban la epitelización a las 2-3 semanas de la inyección. Este efecto beneficioso no era mantenido en el tiempo.

Los resultados de nuestra serie demostraron que el daño epitelial inicial tras una causticación no era estable y que existía una tendencia a aumentar el tamaño del defecto durante las primeras dos semanas, momento en el cual comenzaba a manifestarse la reepitelización. Cuando comenzaba a cerrar, esto es, entre las 2 y 3 semanas, esta epitelización se producía de forma más rápida en ojos tratados con ASCs respecto a ojos controles, concretamente en el grupo inyección esta aceleración en la epitelización alcanzaba significación estadística. El porcentaje de defecto epitelial residual a las cuatro semanas oscilaba en torno al 31% en ojos donde se aplicaban ASCs respecto al 35% de defecto epitelial, en los ojos donde no se aplicaban.

Nuestros resultados difieren de los publicados recientemente por el grupo de Yao(Yao, Li et al., 2012) que observa epitelización total a los 3 días en 7 de 8 ojos tratados y en ningún ojo control y a los 7 días en todos los ojos tratados y sólo en dos de los controles, utilizando una forma de aplicación muy similar a la nuestra, inyección perilimbar de MO-MSCs. Sí están en concordancia con los estudios de Jiang(Jiang, Cai et al.) o Ma(Y, 2006), que, pese a obtener diferencias significativas en la epitelización comparando con ojos controles, los defectos epiteliales a las 4 semanas oscilan desde un 25% a 50%. En la serie de Ma, al mes, el 62,5% de los ojos tratados con MSCs sobre sustrato de MA presentaban defectos epiteliales de aproximadamente el 25% de la superficie corneal.

El mecanismo por el cual la aplicación de las células madre mesenquimales favorece la epitelización es desconocido. Algunos autores abogan por un mecanismo de diferenciación de las MSCs a células epiteliales (Gu, Xing et al., 2009, Jiang, Cai et al.) mientras que otros, optan porque es la disminución de la inflamación y de la angiogénesis corneal, por un acondicionamiento del nicho, lo que favorece la

epitelización independientemente del tipo de epitelio que lo regenere (Ma, Chen et al., 2009, Oh, Kim et al., 2008).

Puesto que las ASCs son de estirpe mesenquimal, la diferenciación a otra línea germinal, supondría la transdiferenciación. Existen dos grupos de investigadores que defienden esta hipótesis: el grupo de Gu (Gu, Xing et al., 2009) y el de Jiang (Jiang, Cai et al.). Ambos sostienen que la diferenciación a epitelio corneal es posible siempre que el cultivo de las MSCs se induzca con un cocultivo a base de tejido limbar o estromal corneal. Gu lo demuestra tanto in vitro, aunque la diferenciación no dura más de tres días, como in vivo, sobre un total de 10 ojos de conejos, Jiang lo demuestra en un estudio experimental sobre ratas.

En nuestro grupo de experimentos se observó que el defecto epitelial no permanecía estable durante las primeras dos semanas, sino que aumentaba. La inflamación y angiogénesis podrían justificar estos hallazgos: Por una parte, mientras exista un estímulo inflamatorio, inherente a los 14 primeros días de cualquier causticación corneal, no es posible que exista una epitelización corneal adecuada (Wagoner, 1997). Por otra parte, habría una tendencia a aumentar el DE hasta que las células limbares remanentes comiencen a proliferar y diferenciarse y las células amplificadoras transitorias comiencen a llegar a la zona y cubrir el defecto (Thoft and Friend, 1983). Este efecto de epitelización más rápida lo hemos observado en el grupo de experimentos donde se aplicaban ASCs.

La epitelización se manifestó a partir de las dos semanas cuando los mecanismos reparadores fisiológicos que habían comenzado en etapas anteriores comenzaron a ser evidentes. Las ASCs aplicadas en la fase aguda de la quemadura podrían facilitar la acción de las células madre limbares remanentes mejorando las condiciones de su nicho por mecanismos paracrinicos o disminuyendo la inflamación del nicho (Oh, Kim et al., 2008).

A pesar de la acción conocida de la MA sobre la epitelización corneal por medio de su membrana basal, propiedad que se ha utilizado para servir como sustrato y transportador en trasplantes de células epiteliales limbares (Shimazaki, Aiba et al., 2002), nuestros resultados no mostraron mayor eficacia en cuanto a epitelización en el grupo MA-ASCs respecto al resto de grupos. Por otra parte, cuando las causticaciones son graves la MA no ha demostrado una eficacia mayor sobre el tratamiento médico (López-García, Rivas Jara et al., 2007, Tamhane, Vajpayee et al., 2005).

3.3. PERFORACIÓN CORNEAL, ADELGAZAMIENTO Y CALCIFICACIONES CORNEALES.

El tratamiento con ASCs inyectadas o implantadas bajo MA, disminuyó la aparición de calcificación, adelgazamiento y perforación corneal.

Respecto al único caso de calcificación corneal que ocurrió en el grupo de ojos tratados con ASCs, la calcificación ya estaba presente antes de asignar al grupo de tratamiento. Aunque las células mesenquimales no contribuyeron a la remisión de la calcificación en este ojo, en el resto de los casos el evento calcificación corneal aconteció de nuevas en ojos donde no se habían inyectado ASCs. Asumiendo que las calcificaciones se dan en ojos con un nivel de inflamación alto, las ASCs evitaron su desarrollo probablemente por disminución del grado de inflamación.

El menor grado de adelgazamiento y perforación además de por el efecto antiinflamatorio, se explica también por el mayor grado de fibrosis obtenido en córneas de ojos tratados con ASCs como se comentará posteriormente en el apartado fibrosis.

Paradójicamente los resultados de nuestros experimentos observaron una alta incidencia de perforaciones corneales en los ojos donde se aplicó MA.

El melting corneal como complicación del trasplante de MA es una complicación rara pero que está descrita en la literatura, especialmente en pacientes sensibilizados (Schechter, Rand et al., 2005). Aunque el uso de MA que contiene epitelio viable es más efectivo en la supresión de la inflamación que la MA desnuda (Hori, Wang et al., 2006), efecto que nosotros tratábamos de conseguir, tiene como desventaja la presencia de antígenos MHC de clase I en las células epiteliales, que explicarían la respuesta inmunológica inducida en el receptor. La inmunogenicidad de la MA criopreservada es menor que la de los tejidos frescos. Sin embargo, más del 50% de las células epiteliales criopreservadas durante más de dos meses permanecen viables y crecen en cultivos (Kubo, Sonoda et al., 2001).

En nuestro grupo de experimentos trasplantamos xenoinjertos de MA humana criopreservada que no había sido desnuda previamente. Es posible que estas células epiteliales, aplicadas sobre un lecho corneal que carecía de privilegio inmunológico, por la propia vascularización de la causticación estimularan la llegada de células presentadoras de antígeno y mediadores inflamatorios hacia la membrana amniótica y secundariamente a la córnea subyacente.

4. EVALUACIÓN HISTOLÓGICA

4.1. EFECTO ANTIINFLAMATORIO

A las 12-24 horas de una causticación corneal, se produce una llegada masiva de PMN neutrófilos y macrófagos a la córnea, que produce la liberación de mediadores inflamatorios, lo que a su vez facilita el daño corneal (Wagoner, 1997, Wilson, Mohan et al., 2001).

Las MSCs promueven la reparación de tejidos a través de la liberación de factores solubles que modulan la inflamación. Esto constituye una de las principales ventajas de las MSCs respecto a las células epiteliales limbares o de mucosa oral (Block, Ohkouchi et al., 2008, Oh, Kim et al., 2008, Y, 2006, Yao, Li et al., 2012)

En la fase aguda de la inflamación parece ser que las principales células sobre las que actúan las MSCs son los macrófagos. Las MSCs favorecen el cambio de los macrófagos hacia un perfil antiinflamatorio, favoreciéndoles en la producción de IL-6 e IL-10, citoquinas antiinflamatorias, y disminuyendo la de IL-12 (Block, Ohkouchi et al., 2008, Kim and Hematti, 2009, Maggini, Mirkin et al., 2010).

Nosotros hemos evaluado los resultados anatomopatológicos en la fase crónica de la inflamación, transcurridas 4 semanas desde la aplicación de ASCs. La variabilidad en los resultados lo explica el tamaño muestral reducido.

No encontramos que las ASCs modificasen el tipo de celularidad predominante propio de esta fase tanto en limbo como en córnea en ninguno de las modalidades de aplicación.

Respecto al grado de inflamación en el modelo inyección obtuvimos que a nivel del limbo, lugar donde se inyectaban las células, la inflamación en ojos donde aplicábamos ASCs era de menor grado que en ojos donde no se aplicaban. En el modelo de inyección, a nivel corneal también se demostró que el grado de inflamación fue menor en ojos donde aplicamos ASCs. Por tanto, la disminución de la inflamación evidenciada histológicamente está en concordancia con los resultados clínicos de menor número de calcificaciones, adelgazamientos y perforaciones corneales en aquellos ojos que habían sido tratados mediante inyección de ASCs.

Los resultados de la inflamación en el grupo que utilizaba MA difirieron de los obtenidos en el grupo inyección. La diferente localización en la aplicación de las ASCs, esta vez sobre la superficie corneal podrían explicarlo. Los grados de inflamación

corneal en ojos donde se aplicaban ASCs fueron menores que en el grupo sin aplicación de ASCs. La diferencia a nivel del limbo en este grupo no fue valorable por el bajo tamaño muestral.

De nuevo, teniendo en cuenta que en el grupo MA hubo perforación en cuatro ojos tratados sólo con MA, índice indirecto del grado de inflamación de la córnea y que histológicamente demostramos inflamación grave en otros tres de los cuatro ojos no perforados de este grupo, los ojos tratados sólo con MA presentaron mayor grado de inflamación grave que los ojos tratados con ASCs utilizando como soporte MA. En esta afirmación, sin embargo, debemos tener en cuenta la posibilidad de que la perforación haya sido provocada por una infección. A diferencia de la inyección limbar de ASCs, la implantación de estas células sobre MA supone mayor tiempo quirúrgico y más manipulación y, por tanto, más riesgo de infección.

El patrón de inflamación predominante en los ojos donde se aplicaba MA, tanto en el grupo MA-ASCs como MA, era de fundamentalmente de tipo agudo. En estudios experimentales y posteriormente en queratitis herpéticas se ha visto que los trasplantes de MA secuestran PMN, por adhesión de estas células inflamatorias al ácido hialurónico del estroma de la MA(Higa, Shimmura et al., 2005). Este mecanismo facilita la digestión de productos apoptóticos líticos de las células inflamatorias disminuyendo el melting y por tanto, el adelgazamiento corneal. Este efecto no se ha reproducido en nuestro modelo de causticación, donde la MA se ha relacionado con mayor grado de adelgazamiento/perforación. Sin embargo, el secuestro de PMN bajo la MA podría explicar la persistencia de un patrón inflamatorio agudo.

Nuestros resultados están en la línea de los estudios de Ma y Oh(Ma, Xu et al., 2006, Oh, Kim et al., 2008) que observan una disminución de la inflamación en fase crónica al aplicar células mesenquimales a la semana de la causticación. Ellos lo demuestran por una disminución de células CD45,(marcador pan-leucocitario) IL-2 y MMP-2 (Ma, Xu et al., 2006), CD4+ e interferon γ (INF γ), así como un aumento de IL-10 por las células dendríticas, TGF e IL-6 (Oh, Kim et al., 2008).

Respecto al comportamiento de las ASCs sobre la inflamación corneal en fase aguda, Yao et al.(Yao, Li et al., 2012) publican un estudio en que observan que a nivel corneal las MSCs aplicadas en las primeras 72 horas del daño disminuyen la infiltración de macrófagos y de las citoquinas liberadas por éstos como TNF α a los 3 y 8 días(Yao, Li et al., 2012). El mecanismo por el que lo producen parece ser una inhibición de la liberación por las células epiteliales corneales de MIP-1 α , citoquina implicada en la quimiotaxis de macrófagos(DiPietro, Burdick et al., 1998). Estos resultados de Yao

difieren del comportamiento de ASCs aplicadas en otros tejidos, donde de forma aguda la aplicación de ASCs producen una migración de macrófagos, acortando la duración de dicha fase.(Georgiev-Hristov, García-Arranz et al., 2012, Kim and Hematti, 2009, Maggini, Mirkin et al., 2010).

5. EVALUACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA

5.1. FIBROSIS CORNEAL

Los estudios de inmunofluorescencia para α -actina revelaron mayor grado de queratocitos activados y fibrosis activa a nivel de estroma corneal en el grupo tratado mediante MA-ASCs respecto a grupo MA. Este mismo efecto se observó también a nivel estromal corneal mediante el procedimiento inyección de ASCs. El grado de fibrosis limbar en ojos tratados con ASCs y no ASCs mediante el procedimiento inyección fue similar. El efecto fibrosis no pudo ser valorado para el procedimiento que usaba MA debido a la escasa disponibilidad de tejido.

Las MSCs comparten propiedades con los fibroblastos, y expresan marcadores de células miofibroblásticas como actina y vimentina (Ishizaki, Wakamatsu et al., 1994, Ye, Yao et al., 2006). Es plausible que las MSCs depositadas sobre el tejido corneal dañado se diferencien a miofibroblastos-queratocitos o que por contacto directo estimulen a los queratocitos corneales. Respecto al papel de la MA, existe evidencia de la actividad antifibrótica que tiene la MA (Tseng, Li et al., 1999). En pacientes con causticaciones severas, el trasplante de limbo combinado con MA estimula la función de los queratocitos e induce incremento de fibras de colágeno, en contraste con el trasplante de limbo sólo, dando lugar a una mayor regeneración del estroma (López-García, Rivas Jara et al., 2007). Sin embargo, no observamos este efecto en nuestro grupo de experimentos si se aplicaba de forma única.

Los resultados de nuestros experimentos no revelaron mayor grado de fibrosis a nivel conjuntival limbar en ojos tratados mediante el procedimiento inyección. Esto resulta un efecto beneficioso que justifica que la inyección limbar no produce iatrogenia a nivel del nicho.

La mayor fibrosis a nivel de la córnea en ojos tratados con ASCs podría explicar el menor grado de perforaciones corneales durante el primer mes en estos grupos de ojos.

5.2. DIFERENCIACIÓN EPITELIAL

La terapia celular regenerativa fue el primera área terapéutica concebida para las MSCs como fuente regeneradora de osteocitos, adipocitos, condrocitos o precursores de músculo. El rol de las MSCs en la regeneración de tejidos no mesenquimales, como es el epitelio corneal, es más controvertido.

La existencia de diferenciación a epitelio corneal se demuestra por dos características: la ausencia de células caliciformes en la córnea y la presencia de un epitelio con CK3 y CK12 .

La pérdida de células caliciformes con el tiempo en la córnea del conejo, demostrado por algunos autores (Reinshagen, Auw-Haedrich et al., 2009) y la existencia de una desepitelización parcial explican que no identificásemos células caliciformes en todos los ojos con insuficiencia límbica.

Los resultados inmunohistológicos de los cortes evaluados en este estudio demostraron patrón CK3, esto es, fenotipo corneal, en dos ojos tratados con ASCs, uno mediante procedimiento inyección y otro utilizando sustrato de MA. La positividad para CK3 de estos dos casos difería del aspecto clínico, que presentaba NVC e irregularidad del epitelio. Esta falta de correlación entre el aspecto clínico del epitelio corneal y su fenotipo ha sido descrita también en otros estudios, observando expresión de CK3 y CK12 en el epitelio conjuntival de córneas causticadas (Wei, Wu et al., 1993) o clusters de células epiteliales corneales en el epitelio conjuntival humano normal (Kawasaki, Tanioka et al., 2006). En modelos animales de causticación en conejos, algunos autores obtienen existencia de CK3/CK12 en córneas causticadas (Kim and Tseng, 1995, Reinshagen, Auw-Haedrich et al., 2009)

Respecto a los factores que influyen en la diferenciación de las células MSCs en líneas epiteliales corneales, las últimas evidencias sugieren la necesidad de una prediferenciación in vitro que dé lugar a la inducción de las MSCs a epitelio corneal mediante cultivos con células propias del estroma o del limbo corneal para la consecución de un epitelio diferenciado (Espana, Kawakita et al., 2003) (Gu, Xing et al., 2009, Jiang, Cai et al., Jiang, Cai et al., 2010). En la obtención del medio de cultivo más factible de MSCs, están trabajando muchos grupos de investigación con células madre.

6. PROCEDIMIENTO DE APLICACIÓN

Hasta el momento, este es el único estudio que compara la técnica de la inyección limbar de ASCs frente al trasplante de ASCs sobre MA.

Mientras que las células madre epiteliales no son adherentes y precisan de un soporte para ser aplicadas eficazmente sobre la superficie ocular (Di Girolamo, Bosch et al., 2009, Higa and Shimazaki, 2008, Nishida, Yamato et al., 2004), la aplicabilidad de las células troncales mesenquimales se puede realizar de diversas formas: Algunos autores aprovechan el “homing” de MSCs hacia los tejidos inflamados o con daño administrándolas de forma intravenosa (Ye, Yao et al., 2006); otros, basados en su capacidad de adhesión, utilizan la forma tópica (Oh, Kim et al., 2008), otros autores utilizan sustratos como fibrina (Gu, Xing et al., 2009), o membrana amniótica y expanden y transplantan láminas de MSCs (Jiang, Cai et al., Ma, Xu et al., 2006, Reinshagen, Auw-Haedrich et al., 2009). Recientemente un grupo ha utilizado una técnica de inyección subconjuntival (Yao, Li et al., 2012) similar a la que nosotros hemos utilizado en un grupo de nuestro estudio.

El uso de fibrina como sustrato es lo que algunos autores han denominado “expansión libre de sustrato” dada la reabsorción de la lámina de fibrina a las 24 horas. Pellegrini en una revisión de 2007 sostiene que la fibrina es el único sustrato capaz de mantener la holocloneidad y proliferación de las células a largo plazo (Pellegrini, De Luca et al., 2007). La fibrina constituye un soporte ideal, ya que no altera las células cultivadas, y tiene propiedades adhesivas, por lo que no son necesarias suturas para fijarlas a los tejidos. Además, es capaz de proteger el tejido proliferativo durante su transporte y cirugía. Las láminas epiteliales que se generan sobre un sustrato de fibrina adquieren mayor grado de diferenciación que sobre MA (Higa and Shimazaki, 2008, Higa, Shimmura et al., 2007).

La Membrana Amniótica (MA), constituye un sustrato también ideal porque ofrece efecto antiinflamatorio y antiangiogénico. Su membrana basal es semejante a la membrana basal del epitelio corneal. Contiene factores de crecimiento como FGF, hGF y TGF, que estimulan la epitelización y también modulan la proliferación y diferenciación de los fibroblastos estromales. A nivel del estroma inhibe la expresión de citoquinas inflamatorias de la superficie ocular, como IL1a, IL2, IL8, INF- γ y PDGF. El colágeno tipo IV y la laminina de la membrana basal actúan como sustrato para el crecimiento epitelial. Por sus propiedades, la MA proporciona un “nicho” para la expansión ex vivo de las células madre. La MA desepitelizada, usada como sustrato, con un medio libre de suero, bajo en calcio y en condiciones de hipoxia, consigue

células epiteliales en un estado menos diferenciado, sugiriendo que el microambiente es crucial para mantener un estado indiferenciado (Grueterich, Espana et al., 2002, Grueterich and Tseng, 2002).

Determinadas lentes de contacto terapéuticas también se han asociado con la proliferación y migración de LESC's (Di Girolamo, Bosch et al., 2009). Aunque puede ser un buen abordaje para ASC's, la estrategia a seguir no está del todo definida.

Por último, el polímero Poly(N-isopropylacrylamide) (PIPAAm), es un soporte dependiente de temperatura, de forma que a menos de 30°C pierde su capacidad de adhesión a las células (Nishida, Yamato et al., 2004). Está por determinar cómo afecta este soporte al comportamiento celular.

Dada la importancia que tienen las condiciones fisicoquímicas que rodean las LESC's, esto es el nicho, es crucial un modelo de aplicación que respete este microambiente.

No hemos demostrado en nuestro grupo de experimentos iatrogenicidad a nivel del limbo con ninguno de los modelos de aplicación. Los grados de fibrosis limbar fueron similares en los grupos que utilizaron el modelo inyección y no valorable por falta de muestra en el modelo de MA. Este hallazgo es importante porque demuestra que la inyección de ASC's en una estructura compleja y delicada como es el limbo no ha tenido ningún efecto nocivo.

La inyección subconjuntival supone un procedimiento sencillo, económico y fácil que no requiere la necesidad de un sustrato aunque tiene el riesgo teórico de la iatrogenicidad sobre el limbo por el traumatismo de la aguja. La inyección se realiza con una aguja de 25G, con lo que el traumatismo de existir, es mínimo.

El modelo que utiliza MA tiene como ventajas que facilita el contacto de las ASC's a la superficie ocular el mayor tiempo posible unido a los posibles efectos beneficiosos propios de la MA. En este sentido, las ASC's sobre la SO podrían comportarse de tres maneras: que se extiendan sobre la córnea, que penetren y asienten bajo la conjuntiva o que sean lavadas por la película lagrimal. Como inconvenientes, la implantación de MA supone un procedimiento largo, que requiere de habilidad quirúrgica por parte del cirujano y que tiene como riesgo el desarrollo de las complicaciones derivadas de una cirugía, además de suponer un coste añadido. En nuestro caso, existieron más perforaciones corneales en este grupo, y la existencia de dos melting posiblemente por abscesos corneales.

Hemos demostrado, por tanto, la existencia de ASCs en el tejido ocular tras aplicar dos modelos de administración diferentes sin inducir iatrogenia aparente en ninguno de ellos.

7. PERFECCIONAMIENTO DEL MODELO APLICADO Y PERSPECTIVAS FUTURAS.

Hasta nuestro conocimiento, este trabajo representa la primera línea de investigación realizada con células troncales mesenquimales procedentes del tejido adiposo para la regeneración de la superficie ocular tras causticaciones corneales.

Con el fin de su aplicación en la práctica clínica en un futuro, existen algunos puntos que deben ser perfeccionados:

-Diferenciación celular. Para poder conseguir una regeneración epitelial con fenotipo corneal a partir de ASCs, es fundamental establecer el medio de cultivo más favorable. Los últimos estudios demuestran que el co-cultivo con estroma corneal o limbar induciría el microambiente adecuado para conseguir la diferenciación de estas células (Gu, Xing et al., 2009, Jiang, Cai et al., 2010). Esto permitiría trasplantar a partir de células troncales mesenquimales, láminas epiteliales diferenciadas que reconstruirían la SO. Faltaría por dilucidar si estas láminas pueden ser mantenidas en el ojo receptor a largo plazo.

-Determinación del número de células a implantar. Con el objetivo de lograr efectos clínicos más satisfactorios es posible que se necesiten mayores dosis celulares o debido al efecto turnover, la necesidad de aplicar dosis repetidas de ASCs.

-Tratamientos coadyuvantes: Nuestro trabajo no ha permitido discernir el papel de las ASCs en la NVC, ya que no ha demostrado un aumento de los neovasos pero tampoco ha demostrado su inhibición y esto es una limitación en el tratamiento de la patología corneal. En otros tejidos la neovascularización es paralela a la regeneración. En la córnea la neovascularización supone opacidad, edema y pérdida de visión. Quizás debamos plantear la utilización de sustancias antiangiogénicas si queremos modular la NVC.

-Investigación de otras formas de administración que supongan mayor facilidad de aplicación como en forma de colirio, basados en la capacidad de adhesión y migración de ASCs, o la utilización de otros sustratos que mantengan la capacidad de diferenciación del tejido trasplantado como son el uso de fibrina o de lentes de contacto.

-Establecer otras aplicaciones: Por último, la demostración del perfil inmunoregulador y de diferenciación de estas células, ofrece la posibilidad de aplicarlas en situaciones distintas a las causticaciones como trasplantes de córnea con alto riesgo de rechazo, en enfermedades inflamatorias o infecciosas con riesgo de melting o como tratamiento simultáneo a la queratoplastia en insuficiencias límbricas.

El resultado de este grupo de experimentos permiten concluir que las ASCs son una alternativa en el tratamiento de las causticaciones corneales graves, modulando la inflamación y disminuyendo la posibilidad de perforación. Un aspecto a resaltar de las ASCs es la ausencia de rechazo, lo cual abre la posibilidad de su uso alogénico.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación llevan a las siguientes conclusiones:

Primera: La aplicación de ASCs como tratamiento de una causticación de la superficie corneal en fase precoz, disminuye el número de perforaciones y calcificaciones corneales.

Segunda: El uso de ASCs sobre la superficie ocular no interfiere en el curso de la neovascularización corneal propia de la causticación corneal.

Tercera: La aplicación de ASCs en un modelo de causticación corneal acelera el cierre del defecto epitelial, siendo más efectiva en la vía de administración subconjuntival.

Cuarta: El tratamiento con ASCs en un modelo de causticación corneal aumenta la fibrosis a nivel corneal.

Quinta: Las ASCs disminuyen el grado de inflamación en el lugar donde se aplican.

Sexta: Las ASCs aplicadas sobre la superficie ocular constituyen un procedimiento seguro, no habiendo encontrado ningún efecto adverso.

Séptima: La aplicación de ASCs mediante inyección perilimbar es superior a un modelo con sustrato MA, por cuanto que acelera el cierre del defecto epitelial.

Octava: Las ASCs son eficaces y seguras en el tratamiento agudo de la causticación corneal y queratopatía secundaria a insuficiencia límica.

BIBLIOGRAFÍA

Abraham, S., et al. (2003). Regulation of MCP-1 gene transcription by Smads and HIV-1 Tat in human glial cells. *Virology* 309(2) 196-202.

Adamis, A. P., B. Meklir and N. C. Joyce (1991). In situ injury-induced release of basic-fibroblast growth factor from corneal epithelial cells. *Am J Pathol* 139(5) 961-967.

Anderson, D. F., et al. (2001). Amniotic membrane transplantation for partial limbal stem cell deficiency. *Br J Ophthalmol* 85(5) 567-575.

Arnalich-Montiel, F., et al. (2008). Adipose-derived stem cells are a source for cell therapy of the corneal stroma. *Stem Cells* 26(2) 570-579.

Auw-Haedrich, C., et al. (2011). Immunohistochemical expression of epithelial cell markers in corneas with congenital aniridia and ocular cicatrizing pemphigoid. *Acta Ophthalmol* 89(1) 47-53.

Baylis, O., et al. (2011). 13 years of cultured limbal epithelial cell therapy: a review of the outcomes. *J Cell Biochem* 112(4) 993-1002.

Block, G. J., et al. (2008). Multipotent Stromal Cells (MSCs) are Activated to Reduce Apoptosis in Part by Upregulation and Secretion of Stanniocalcin-1 (STC-1). *Stem Cells*.

Brzoska, M., et al. (2005). Epithelial differentiation of human adipose tissue-derived adult stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 330(1) 142-150.

Calonge, M., et al. (2004). Impression cytology of the ocular surface: a review. *Exp Eye Res* 78(3) 457-472.

Cauchi, P. A., et al. (2008). A systematic literature review of surgical interventions for limbal stem cell deficiency in humans. *Am J Ophthalmol* 146(2) 251-259.

Cotsarelis, G., et al. (1989). Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate: implications on epithelial stem cells. *Cell* 57(2) 201-209.

Daniel Ramos Parente (2002). Experimental models of limbal stem cell deficiency in rabbits - clinical study. *Arq Bras Oftalmol* 65 153-160.

Davis, F. A. (1929). The Anatomy and Histology of the Eye and Orbit of the Rabbit. *Trans Am Ophthalmol Soc* 27 400.402-441.

Daya, S. M., et al. (2005). Outcomes and DNA analysis of ex vivo expanded stem cell allograft for ocular surface reconstruction. *Ophthalmology* 112(3) 470-477.

Di Girolamo, N., et al. (2009). A contact lens-based technique for expansion and transplantation of autologous epithelial progenitors for ocular surface reconstruction. *Transplantation* 87(10) 1571-1578.

Di Rocco, G., et al. (2006). Myogenic potential of adipose-tissue-derived cells. *J Cell Sci* 119(Pt 14) 2945-2952.

DiPietro, L. A., et al. (1998). MIP-1alpha as a critical macrophage chemoattractant in murine wound repair. *J Clin Invest* 101(8) 1693-1698.

Dominici, M., et al. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8(4) 315-317.

Dravida, S., et al. (2005). The transdifferentiation potential of limbal fibroblast-like cells. *Brain Res Dev Brain Res* 160(2) 239-251.

Du, Y., et al. (2003). Functional reconstruction of rabbit corneal epithelium by human limbal cells cultured on amniotic membrane. *Mol Vis*. United States. 635-643.

Dua, H. S. (1998). The conjunctiva in corneal epithelial wound healing. *Br J Ophthalmol* 82(12) 1407-1411.

Dua, H. S., et al. (2009). The role of limbal stem cells in corneal epithelial maintenance: testing the dogma. *Ophthalmology* 116(5) 856-863.

Dua, H. S., A. Miri and D. G. Said (2010). Contemporary limbal stem cell transplantation - a review. *Clin Experiment Ophthalmol* 38(2) 104-117.

Dua, H. S., et al. (2000). Limbal stem cell deficiency: concept, aetiology, clinical presentation, diagnosis and management. *Indian J Ophthalmol* 48(2) 83-92.

Dursun, D., et al. (2001). Treatment of recalcitrant recurrent corneal erosions with inhibitors of matrix metalloproteinase-9, doxycycline and corticosteroids. *Am J Ophthalmol* 132(1) 8-13.

Erickson, G. R., et al. (2002). Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 290(2) 763-769.

Espana, E. M., et al. (2003). Stromal niche controls the plasticity of limbal and corneal epithelial differentiation in a rabbit model of recombined tissue. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44(12) 5130-5135.

Fang, B., et al. (2007). Using human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as salvage therapy for hepatic graft-versus-host disease resembling acute hepatitis. *Transplant Proc* 39(5) 1710-1713.

Fang, B., et al. (2006). Treatment of severe therapy-resistant acute graft-versus-host disease with human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Bone Marrow Transplant* 38(5) 389-390.

Fraser, J. K., et al. (2006). Plasticity of human adipose stem cells toward endothelial cells and cardiomyocytes. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 3 Suppl 1 S33-37.

Friedenstein, A. J., I. I. Piatetzky-Shapiro and K. V. Petrakova (1966). Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol* 16(3) 381-390.

García-Gómez, I., et al. (2010). Mesenchymal stem cells: biological properties and clinical applications. *Expert Opin Biol Ther* 10(10) 1453-1468.

García-Olmo, D., et al. (2003). Autologous stem cell transplantation for treatment of rectovaginal fistula in perianal Crohn's disease: a new cell-based therapy. *Int J Colorectal Dis* 18(5) 451-454.

Gaustad, K. G., et al. (2004). Differentiation of human adipose tissue stem cells using extracts of rat cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 314(2) 420-427.

Georgiev-Hristov, T., et al. (2012). Sutures enriched with adipose-derived stem cells decrease the local acute inflammation after tracheal anastomosis in a murine model. *Eur J Cardiothorac Surg*.

Ghajar, C. M., et al. (2006). Mesenchymal stem cells enhance angiogenesis in mechanically viable prevascularized tissues via early matrix metalloproteinase upregulation. *Tissue Eng* 12(10) 2875-2888.

González, M. A., et al. (2009). Adipose-derived mesenchymal stem cells alleviate experimental colitis by inhibiting inflammatory and autoimmune responses. *Gastroenterology* 136(3) 978-989.

Granelli-Piperno, A., J. D. Vassalli and E. Reich (1977). Secretion of plasminogen activator by human polymorphonuclear leukocytes. Modulation by glucocorticoids and other effectors. *J Exp Med* 146(6) 1693-1706.

Gronthos, S., et al. (2001). Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol* 189(1) 54-63.

Grueterich, M., E. Espana and S. C. Tseng (2002). Connexin 43 expression and proliferation of human limbal epithelium on intact and denuded amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43(1) 63-71.

Grueterich, M., E. M. Espana and S. C. Tseng (2003). Ex vivo expansion of limbal epithelial stem cells: amniotic membrane serving as a stem cell niche. *Surv Ophthalmol* 48(6) 631-646.

Grueterich, M. and S. C. Tseng (2002). Human limbal progenitor cells expanded on intact amniotic membrane ex vivo. *Arch Ophthalmol* 120(6) 783-790.

Gu, S., et al. (2009). Differentiation of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells into corneal epithelial cells in vivo and ex vivo. *Mol Vis* 15 99-107.

Götherström, C. (2007). Immunomodulation by multipotent mesenchymal stromal cells. *Transplantation* 84(1 Suppl) S35-37.

Halvorsen, Y. C., W. O. Wilkison and J. M. Gimble (2000). Adipose-derived stromal cells--their utility and potential in bone formation. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24 Suppl 4 S41-44.

Hao, Y., et al. (2000). Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane. *Cornea* 19(3) 348-352.

Higa, K. and J. Shimazaki (2008). Recent advances in cultivated epithelial transplantation. *Cornea* 27 Suppl 1 S41-47.

Higa, K., et al. (2007). Proliferation and differentiation of transplantable rabbit epithelial sheets engineered with or without an amniotic membrane carrier. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48(2) 597-604.

Higa, K., et al. (2005). Hyaluronic acid-CD44 interaction mediates the adhesion of lymphocytes by amniotic membrane stroma. *Cornea* 24(2) 206-212.

Hirst, L. W., et al. (1981). Comparative studies of corneal surface injury in the monkey and rabbit. *Arch Ophthalmol* 99(6) 1066-1073.

Hori, J., et al. (2006). Immunological characteristics of amniotic epithelium. *Cornea* 25(10 Suppl 1) S53-58.

Ilari, L. and S. M. Daya (2002). Long-term outcomes of keratolimbal allograft for the treatment of severe ocular surface disorders. *Ophthalmology* 109(7) 1278-1284.

Inatomi, T., et al. (2006). Midterm results on ocular surface reconstruction using cultivated autologous oral mucosal epithelial transplantation. *Am J Ophthalmol* 141(2) 267-275.

Ishizaki, M., et al. (1994). Dynamics of the expression of cytoskeleton components and adherens molecules by fibroblastic cells in alkali-burned and lacerated corneas. *Exp Eye Res* 59(5) 537-549.

Jang, I. K., et al. (2006). Transplantation of reconstructed corneal layer composed of corneal epithelium and fibroblasts on a lyophilized amniotic membrane to severely alkali-burned cornea. *Artif Organs*. United States. 424-431.

Jester, J. V., et al. (2002). TGFbeta induced myofibroblast differentiation of rabbit keratocytes requires synergistic TGFbeta, PDGF and integrin signaling. *Exp Eye Res* 75(6) 645-657.

Jiang, T. S., et al. Reconstruction of the corneal epithelium with induced marrow mesenchymal stem cells in rats. *Mol Vis* 16 1304-1316.

Jiang, T. S., et al. (2010). Reconstruction of the corneal epithelium with induced marrow mesenchymal stem cells in rats. *Mol Vis* 16 1304-1316.

Jones, B. J. and S. J. McTaggart (2008). Immunosuppression by mesenchymal stromal cells: from culture to clinic. *Exp Hematol* 36(6) 733-741.

JP, M. (1987). Chemical injuries. *The Cornea: Scientific Foundation and Clinical Practice*. Boston, Little, Brown and Co. 527-542.

Jumblatt, M. M. and A. H. Neufeld (1986). A tissue culture assay of corneal epithelial wound closure. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27(1) 8-13.

Kadar, T., et al. (2011). Delayed Loss of Corneal Epithelial Stem Cells in a Chemical Injury Model Associated with Limbal Stem Cell Deficiency in Rabbits. *Curr Eye Res*.

Kawakita, T., et al. (2007). Achievements and future problems with component surgery of the cornea. *Cornea*. United States. S59-64.

Kawasaki, S., et al. (2006). Clusters of corneal epithelial cells reside ectopically in human conjunctival epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47(4) 1359-1367.

Kenyon, K. R. (1985). Inflammatory mechanisms in corneal ulceration. *Trans Am Ophthalmol Soc* 83 610-663.

Kenyon, K. R., et al. (1979). Prevention of stromal ulceration in the alkali-burned rabbit cornea by glued-on contact lens. Evidence for the role of polymorphonuclear leukocytes in collagen degradation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 18(6) 570-587.

Kenyon, K. R. and S. C. Tseng (1989). Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders. *Ophthalmology* 96(5) 709-722; discussion 722-703.

Kheirkhah, A., et al. (2008). Sutureless amniotic membrane transplantation for partial limbal stem cell deficiency. *Am J Ophthalmol* 145(5) 787-794.

Kim, J. and P. Hematti (2009). Mesenchymal stem cell-educated macrophages: a novel type of alternatively activated macrophages. *Exp Hematol* 37(12) 1445-1453.

Kim, J. C. and S. C. Tseng (1995). Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. *Cornea* 14(5) 473-484.

Kruse, F. E. and S. C. Tseng (1994). [Transforming growth factors beta 1 and 2 inhibit proliferation of limbus and corneal epithelium]. *Ophthalmologe* 91(5) 617-623.

Kubo, M., et al. (2001). Immunogenicity of human amniotic membrane in experimental xenotransplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42(7) 1539-1546.

Lazarus, G. S., et al. (1968). Human granulocyte collagenase. *Science* 159(3822) 1483-1485.

Lee, J. H. and D. M. Kemp (2006). Human adipose-derived stem cells display myogenic potential and perturbed function in hypoxic conditions. *Biochem Biophys Res Commun* 341(3) 882-888.

Li, W., et al. (2007). Niche regulation of corneal epithelial stem cells at the limbus. *Cell Res* 17(1) 26-36.

Liang, L., et al. (2009). Limbal stem cell transplantation: new progresses and challenges. *Eye (Lond)* 23(10) 1946-1953.

Liu, Z. J., Y. Zhuge and O. C. Velazquez (2009). Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem* 106(6) 984-991.

Lopez-Garcia, J. S., L. Rivas and I. Garcia-Lozano (2005). [Severe limbal deficiency treated by combined limbal allograft and amniotic membrane transplantation]. *Arch Soc Esp Oftalmol* 80(7) 405-412.

Luengo Gimeno, F., et al. (2007). Advances in corneal stem-cell transplantation in rabbits with severe ocular alkali burns. *J Cataract Refract Surg*. United States. 1958-1965.

López-García, J. S., et al. (2007). Histopathologic limbus evolution after alkaline burns. *Cornea* 26(9) 1043-1048.

López-García, J. S., L. Rivas and I. García-Lozano (2006). [Corneal epithelium squamous metaplasia determination as diagnostic factor in limbal deficiency]. *Arch Soc Esp Oftalmol* 81(5) 281-288.

Ma, D. H., et al. (2009). Matrix revolution: molecular mechanism for inflammatory corneal neovascularization and restoration of corneal avascularity by epithelial stem cell transplantation. *Ocul Surf* 7(3) 128-144.

Ma, Y., et al. (2006). Reconstruction of chemically burned rat corneal surface by bone marrow-derived human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 24(2) 315-321.

Maggini, J., et al. (2010). Mouse bone marrow-derived mesenchymal stromal cells turn activated macrophages into a regulatory-like profile. *PLoS One* 5(2) e9252.

Maguire, M. G., et al. (1994). Risk factors for corneal graft failure and rejection in the collaborative corneal transplantation studies. Collaborative Corneal Transplantation Studies Research Group. *Ophthalmology* 101(9) 1536-1547.

Matsuda, M., J. L. Ubels and H. F. Edelhauser (1985). A larger corneal epithelial wound closes at a faster rate. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26(6) 897-900.

Miranville, A., et al. (2004). Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation* 110(3) 349-355.

Murube, J. and L. Rivas (2003). Impression cytology on conjunctiva and cornea in dry eye patients establishes a correlation between squamous metaplasia and dry eye clinical severity. *Eur J Ophthalmol* 13(2) 115-127.

Nakagawa, T., et al. (2004). TGF-beta induces proangiogenic and antiangiogenic factors via parallel but distinct Smad pathways. *Kidney Int* 66(2) 605-613.

Nakamura, T. and S. Kinoshita (2003). Ocular surface reconstruction using cultivated mucosal epithelial stem cells. *Cornea* 22(7 Suppl) S75-80.

Nakamura, T., et al. (2003). Successful regrafting of cultivated corneal epithelium using amniotic membrane as a carrier in severe ocular surface disease. *Cornea* 22(1) 70-71.

Nakamura, T., et al. (2011). Long-term results of autologous cultivated oral mucosal epithelial transplantation in the scar phase of severe ocular surface disorders. *Br J Ophthalmol* 95(7) 942-946.

Nishida, K., et al. (2004). Functional bioengineered corneal epithelial sheet grafts from corneal stem cells expanded ex vivo on a temperature-responsive cell culture surface. *Transplantation* 77(3) 379-385.

Noël, D., et al. (2007). Multipotent mesenchymal stromal cells and immune tolerance. *Leuk Lymphoma* 48(7) 1283-1289.

Ogawa, R., et al. (2004). Osteogenic and chondrogenic differentiation by adipose-derived stem cells harvested from GFP transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun* 313(4) 871-877.

Oh, J. Y., et al. (2008). The anti-inflammatory and anti-angiogenic role of mesenchymal stem cells in corneal wound healing following chemical injury. *Stem Cells* 26(4) 1047-1055.

Oh, J. Y., et al. (2009). Cytokine secretion by human mesenchymal stem cells cocultured with damaged corneal epithelial cells. *Cytokine* 46(1) 100-103.

Oh, J. Y., et al. (2010). Anti-inflammatory protein TSG-6 reduces inflammatory damage to the cornea following chemical and mechanical injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(39) 16875-16880.

Paterson, C. A., R. N. Williams and A. V. Parker (1984). Characteristics of polymorphonuclear leukocyte infiltration into the alkali burned eye and the influence of sodium citrate. *Exp Eye Res* 39(6) 701-708.

Pauklin, M., et al. Midterm results of cultivated autologous and allogeneic limbal epithelial transplantation in limbal stem cell deficiency. *Dev Ophthalmol* 45 57-70.

Pellegrini, G., M. De Luca and Y. Arsenijevic (2007). Towards therapeutic application of ocular stem cells. *Semin Cell Dev Biol* 18(6) 805-818.

Pellegrini, G., et al. (2009). Epithelial stem cells in corneal regeneration and epidermal gene therapy. *J Pathol* 217(2) 217-228.

Pellegrini, G., et al. (1997). Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *Lancet* 349(9057) 990-993.

Pfister, R. R. (1983). The effects of chemical injury on the ocular surface. *Ophthalmology* 90(6) 601-609.

Pfister, R. R. and N. Burstein (1976). The alkali burned cornea I. Epithelial and stromal repair. *Exp Eye Res* 23(5) 519-535.

Pfister, R. R., et al. (1984). The effect of citrate and other compounds on PMN incubated in vitro: further studies on the site and mechanism of action of citrate. *Cornea* 3(4) 240-249.

Pfister, R. R., et al. (1987). Alkali-burned collagen produces a locomotory and metabolic stimulant to neutrophils. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28(2) 295-304.

Pfister, R. R., et al. (1988). The effects of oral or intravenous citrate on the activation of neutrophils in vitro. *Cornea* 7(4) 244-251.

Polisetty, N., et al. (2008). Mesenchymal cells from limbal stroma of human eye. *Mol Vis* 14 431-442.

Puissant, B., et al. (2005). Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Br J Haematol* 129(1) 118-129.

Rama, P., et al. (2001). Autologous fibrin-cultured limbal stem cells permanently restore the corneal surface of patients with total limbal stem cell deficiency. *Transplantation* 72(9) 1478-1485.

Rama, P., et al. (2010). Limbal stem-cell therapy and long-term corneal regeneration. *N Engl J Med* 363(2) 147-155.

Rasmusson, I. (2006). Immune modulation by mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res* 312(12) 2169-2179.

Rehman, J., et al. (2004). Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation* 109(10) 1292-1298.

Reim, M., C. Redbrake and N. Schrage (2001). Chemical and thermal injuries of the eyes. Surgical and medical treatment based on clinical and pathophysiological findings. *Arch Soc Esp Oftalmol* 76(2) 79-124.

Reim, M. and C. Teping (1989). Surgical procedures in the treatment of most severe eye burns. Revival of the artificial epithelium. *Acta Ophthalmol Suppl* 192 47-54.

Reinshagen, H., et al. (2009). Corneal surface reconstruction using adult mesenchymal stem cells in experimental limbal stem cell deficiency in rabbits. *Acta Ophthalmol*.

Rheinwald, J. G. and H. Green (1975). Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 6(3) 331-343.

Rivas, L., et al. (1991). Topographical distribution of ocular surface cells by the use of impression cytology. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 69(3) 371-376.

Sacchetti, M., et al. (2005). Clinical and cytological findings in limbal stem cell deficiency. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 243(9) 870-876.

Safford, K. M., et al. (2002). Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 294(2) 371-379.

Safford, K. M., et al. (2004). Characterization of neuronal/glia differentiation of murine adipose-derived adult stromal cells. *Exp Neurol* 187(2) 319-328.

Salem, H. K. and C. Thiemermann (2010). Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. *Stem Cells* 28(3) 585-596.

Santos, M. S., et al. (2005). Survival analysis of conjunctival limbal grafts and amniotic membrane transplantation in eyes with total limbal stem cell deficiency. *Am J Ophthalmol* 140(2) 223-230.

Satake, Y., et al. (2011). Long-term outcome of cultivated oral mucosal epithelial sheet transplantation in treatment of total limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology* 118(8) 1524-1530.

Schechter, B. A., et al. (2005). Corneal melt after amniotic membrane transplant. *Cornea* 24(1) 106-107.

Schermer, A., S. Galvin and T. T. Sun (1986). Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin in vivo and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. *J Cell Biol* 103(1) 49-62.

Schlötzer-Schrehardt, U. and F. E. Kruse (2005). Identification and characterization of limbal stem cells. *Exp Eye Res* 81(3) 247-264.

Secker G.A, D. J. (2009). *Limbal epithelial stem cells of the cornea*.

Seo, M. J., et al. (2005). Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 328(1) 258-264.

Shanmuganathan, V. A., et al. (2007). Morphological characteristics of the limbal epithelial crypt. *Br J Ophthalmol* 91(4) 514-519.

Shimazaki, J., et al. (2002). Transplantation of human limbal epithelium cultivated on amniotic membrane for the treatment of severe ocular surface disorders. *Ophthalmology* 109(7) 1285-1290.

Shimazaki, J., et al. (2007). Factors influencing outcomes in cultivated limbal epithelial transplantation for chronic cicatricial ocular surface disorders. *Am J Ophthalmol* 143(6) 945-953.

Shimmura, S. and K. Tsubota (2008). Surgical treatment of limbal stem cell deficiency: are we really transplanting stem cells? *Am J Ophthalmol* 146(2) 154-155.

Shortt, A. J., et al. (2007). Transplantation of ex vivo cultured limbal epithelial stem cells: a review of techniques and clinical results. *Surv Ophthalmol* 52(5) 483-502.

Song, E., et al. (2005). Transplantation of human limbal cells cultivated on amniotic membrane for reconstruction of rat corneal epithelium after alkaline burn. *Chin Med J (Engl)* 118(11) 927-935.

Sonoda, K. H., et al. (2005). Cellular events in the normal and inflamed cornea. *Cornea*. United States. S50-S54.

Takashima, Y., et al. (2007). Neuroepithelial cells supply an initial transient wave of MSC differentiation. *Cell* 129(7) 1377-1388.

Takács, L., et al. (2009). Stem cells of the adult cornea: from cytometric markers to therapeutic applications. *Cytometry A* 75(1) 54-66.

Tamhane, A., et al. (2005). Evaluation of amniotic membrane transplantation as an adjunct to medical therapy as compared with medical therapy alone in acute ocular burns. *Ophthalmology* 112(11) 1963-1969.

Thoft, R. A. and J. Friend (1983). The X, Y, Z hypothesis of corneal epithelial maintenance. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24(10) 1442-1443.

Ti, S. E., et al. (2002). Factors affecting outcome following transplantation of ex vivo expanded limbal epithelium on amniotic membrane for total limbal deficiency in rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43(8) 2584-2592.

Timper, K., et al. (2006). Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells. *Biochem Biophys Res Commun* 341(4) 1135-1140.

Tsai, R. J. and S. C. Tseng (1995). Effect of stromal inflammation on the outcome of limbal transplantation for corneal surface reconstruction. *Cornea* 14(5) 439-449.

Tseng, S. C., D. Q. Li and X. Ma (1999). Suppression of transforming growth factor-beta isoforms, TGF-beta receptor type II, and myofibroblast differentiation in cultured human corneal and limbal fibroblasts by amniotic membrane matrix. *J Cell Physiol* 179(3) 325-335.

Tseng, S. C., et al. (1998). Amniotic membrane transplantation with or without limbal allografts for corneal surface reconstruction in patients with limbal stem cell deficiency. *Arch Ophthalmol* 116(4) 431-441.

Van Buskirk, E. M. (1989). The anatomy of the limbus. *Eye (Lond)* 3 (Pt 2) 101-108.

van Setten, G. B. (1997). Vascular endothelial growth factor (VEGF) in normal human corneal epithelium: detection and physiological importance. *Acta Ophthalmol Scand* 75(6) 649-652.

Wagoner, M. D. (1997). Chemical injuries of the eye: current concepts in pathophysiology and therapy. *Surv Ophthalmol* 41(4) 275-313.

Wagoner, M. D., et al. (1984). Polymorphonuclear neutrophils delay corneal epithelial wound healing in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25(10) 1217-1220.

Wei, Z. G., et al. (1995). Label-retaining cells are preferentially located in fornical epithelium: implications on conjunctival epithelial homeostasis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36(1) 236-246.

Wei, Z. G., et al. (1993). In vitro growth and differentiation of rabbit bulbar, fornix, and palpebral conjunctival epithelia. Implications on conjunctival epithelial transdifferentiation and stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34(5) 1814-1828.

Williams, R. N., et al. (1982). Quantification of ocular inflammation: evaluation of polymorphonuclear leucocyte infiltration by measuring myeloperoxidase activity. *Curr Eye Res* 2(7) 465-470.

Wilson, S. E., et al. (2001). The corneal wound healing response: cytokine-mediated interaction of the epithelium, stroma, and inflammatory cells. *Prog Retin Eye Res* 20(5) 625-637.

Y, M. (2006). Reconstruction of Chemically Burned Rat Corneal Surface by Bone Marrow–Derived Human Mesenchymal Stem Cells. In X. Y. ed.

Yang, X., et al. (2008). Reconstruction of damaged cornea by autologous transplantation of epidermal adult stem cells. *Mol Vis* 14 1064-1070.

Yao, L., et al. (2012). Role of mesenchymal stem cells on cornea wound healing induced by acute alkali burn. *PLoS One* 7(2) e30842.

Yao, Y. F., et al. (2002). Autologous limbal grafting combined with deep lamellar keratoplasty in unilateral eye with severe chemical or thermal burn at late stage. *Ophthalmology* 109(11) 2011-2017.

Yañez, R., et al. (2006). Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease. *Stem Cells* 24(11) 2582-2591.

Ye, J., K. Yao and J. C. Kim (2006). Mesenchymal stem cell transplantation in a rabbit corneal alkali burn model: engraftment and involvement in wound healing. *Eye (Lond)* 20(4) 482-490.

Zhang, X., et al. (2010). Utilization of human limbal mesenchymal cells as feeder layers for human limbal stem cells cultured on amniotic membrane. *J Tissue Eng Regen Med* 4(1) 38-44.

Zuk, P. A. (2010). The adipose-derived stem cell: looking back and looking ahead. *Mol Biol Cell* 21(11) 1783-1787.

Zuk, P. A., et al. (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 13(12) 4279-4295.

Zuk, P. A., et al. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7(2) 211-228.

